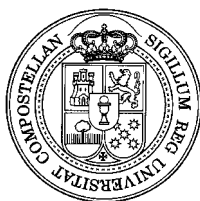


UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología



**ESTUDIO DE NIVELES DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs) EN AVES RAPACES
Y SUS IMPLICACIONES EN EL ECOSISTEMA**

SUSANA GONZÁLEZ AMIGO

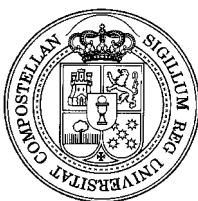
1999

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de Nutrición y Bromatología



**ESTUDIO DE NIVELES DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs) EN AVES RAPACES
Y SUS IMPLICACIONES EN EL ECOSISTEMA**

Memoria presentada por **Susana González Amigo** en la Universidad de Santiago de Compostela para optar al grado de Doctor.

Santiago de Compostela, Junio de 1999.

JESÚS SIMAL LOZANO, CATEDRÁTICO DE ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO, NUTRICIÓN Y TOXICOLOGÍA Y M^a ASUNCIÓN LAGE YUSTY, CATEDRÁTICA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

AUTORIZAN a Dña. Susana González Amigo a presentar el trabajo titulado “ESTUDIO DE NIVELES DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs) EN AVES RAPACES Y SUS IMPLICACIONES EN EL ECOSISTEMA” para optar al Grado de Doctor en Farmacia, el cual ha sido realizado bajo su dirección en los Laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, en Junio de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo. Dr. D. J. Simal Lozano

Fdo. Dra. Dña. M^a A. Lage Yusty

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, a los directores de esta memoria, catedráticos Dr. D. Jesús Simal Lozano y Dra. Dña. M^a Asunción Lage Yusty, por toda la orientación y el apoyo prestado durante estos años, sin olvidar su gran contribución a mi formación personal e investigadora.

A todos los profesores del Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología, por su continua colaboración en mi formación científica.

A todos mis compañeros de este Departamento, tanto a los que están ahora, como a los que ya se fueron, especialmente a Dña. Teresa de Jesús López y López Leyton, a la Dra. Dña. Elena Álvarez Piñeiro, a Dña. Elena Sandomingo López y a la Dra. Dña. Mercedes Sonia García Falcón, por el cordial ambiente de trabajo y por su desinteresada colaboración.

Al Prof. Dr. D. Rafael García-Villanova Ruiz, catedrático del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, por proporcionarnos algunos de los patrones.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de La Coruña, por la ayuda prestada en los programas de espectrofluorimetría FLDM (versión 3..5) y FL WinLab (versión 2.01), y en especial a D. Darío Prada Fernández, Dña. Purificación López Mahía y Dña. Soledad Muñiategui Lorenzo.

Al Dr. D. Jesús Domínguez Conde, profesor titular de Departamento de Biología Animal, de la Universidad de Santiago de Compostela, por facilitarnos información sobre las aves objeto de este estudio.

A la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria, por la financiación del proyecto titulado: "Estudio de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), policlorobifenilos (PCBs) y policloroterfenilos (PCTs) en aves rapaces y sus implicaciones en el ecosistema", y permitieron con ello la realización de este estudio.

Al Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigación de Análisis Alimentarios, y en especial al catedrático Dr. D. Manuel Sanmartín Durán por habernos suministrado las muestras objeto de este estudio.

Y por último, y muy especialmente a D. Manuel Merelles Pérez por demostrarme su confianza y apoyo durante todos estos años.





A mi familia

A mi marido



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XV

INTRODUCCIÓN

1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	1
1.1. NOMENCLATURA	2
1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	5
1.3. ETIOLOGÍA	26
1.3.1. FUENTES NATURALES	26
1.3.2. FUENTES ANTROPOGÉNICAS	27
1.4. OBTENCIÓN COMERCIAL	29
1.5 TOXICOLOGÍA	30
1.5.1 REVISIÓN HISTÓRICA	31
1.5.2 ACTIVACIÓN METABÓLICA	32
1.6 CONTROL	35
2. PRESENCIA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LAS AVES RAPACES	37
2.1 <i>Buteo buteo</i> (RATONERO COMÚN)	39
2.2 <i>Strix aluco</i> (CÁRABO COMÚN)	41
2.3 <i>Tyto alba</i> (LECHUZA)	44
2.4 LEGISLACIÓN	46
3. EXTRACCIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	47
3.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	48
3.1.1 MÉTODO "OFFLINE"	48

3.1.2 MÉTODO "ONLINE"	49
3.2 APLICACIÓN A PROCESOS DE EXTRACCIÓN	50
3.2.1 PODER SOLVENTE, DENSIDAD Y PRESIÓN	50
3.2.2 FLUIDOS Y FLUJO	52
3.3 SOLVENTES MODIFICADORES	53
3.4 ADSORBENTES EN FASE SÓLIDA Y SOBRECARGAS	54
3.5 VENTAJAS	56
3.6 EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS HP7680A	57

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Antecedentes bibliográficos	58
Otras técnicas analíticas	82

OBJETIVO

Objetivo	99
----------	----

PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL Y APARATOS	100
2. ORDENADORES Y PROGRAMAS	101
3. REACTIVOS	102
4. PREPARACIÓN DE PATRONES	103
5. PROTOCOLO ANALÍTICO	103
5.1- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	103
5.2- DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	106
5.3- DETERMINACIÓN DE GRASA	106
5.4- EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	106
6- ANÁLISIS	109
6.1. ANÁLISIS ESPECTROFLUORIMÉTRICO	109
6.2- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	

CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA	111
6.2.1- ADQUISICIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS	112
6.2.2- CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	112
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. HUMEDAD	116
2. GRASA	117
3. EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	121
Elección del adsorbente y modificador	121
Elección de la columna, solvente y volumen de extracción	124
4. ANÁLISIS	127
4.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA	127
4.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA	137
4.2.1 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	144
4.2.2 CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR	145
4.2.3. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN DEL MÉTODO	147
4.2.4. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS	150
4.2.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	158
<i>Niveles de totales</i>	181

CONCLUSIONES

Conclusiones	188
--------------	-----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas	191
----------------------------	-----

ABREVIATURAS

%R: Recuperación por cien
 $\Delta\lambda$: Incremento de longitud de onda
 λ : Longitud de onda
ACN: Acetonitrilo
ACD: Advanced Chemistry Development
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
Ant: Antraceno
ARN: Ácido Ribonucleico
ASE: Accelerated Solvent Extraction
BaA: Benzo[a]Antraceno
BaP: Benzo[a]pireno
BbF: Benzo[b]fluoranteno
BghiP: Benzo[ghi]perileno
BkF: Benzo[k]fluoranteno
BOE: Boletín Oficial del Estado
col. : Colaboradores
CPU: Central Processing Unit
Cri: Criseno
DCM: Diclorometano
DDTs: Diclorodifeniltricloroetano
DME : Dimetiléter
EFE: Enhanced-Fluidity liquid Extraction
 λ_{em} : Longitud de onda de emisión
 λ_{exc} : Longitud de onda de excitación
FID: Flame Ionization Detector
Fig.: Figura
Fl: Fluoranteno
FL: Fluorescencia
FLDM: Fluorescence Data Manager

GC: Gas Chromatography
HCB: Hexaclorobenceno
HCH: Hexaclorohehexano
HMDS: Hexamethyldisilane
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IndP: Indeno[1,2,3,-cd]pireno
IR: Infrarrojo
LC: Liquid Chromatography
LD: Límite de detección
LQ: Límite de cuantificación
MFS: Micro Filtration Systems
MLRs: Minimal Risk Levels
MS: Mass Spectrometry
NBS: National Bureau of Standards
ND: No Detectable
NQ: No cuantificable
ODS: Octadecilsilano
P: Probabilidad
PAC: Polycyclic Aromatic Compound
PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PCBs: Policlorobifenilos
Pir: Pireno
Pm: Peso molecular
PTFE: Polytetrafluoroetileno
RAM: Random Access Memory
RSD%: Relative Standard Desviation %
SD: Standard Desviation
SFC: Supercritical Fluid Chromatography
SFE: Supercritical Fluid Extraction
SRM: Standard reference Materials
SS: Stainless-Steel
TFA: Trifluoroacético

THF: Tetrahidrofurano
TMCS: trimethylchlorosilane
UF: Unidades de Fluorescencia
UV: Ultravioleta
Vis: Visible
WOW: Winner on Windows
X: Media
XAD: Polystyrene Divinylbenzene Copolymer

ORGANISMOS

ACS: American Chemical Society
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
APHA: American Public Health Association
ASTM: American Society for Testing Materials
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CAS: Chemical Abstract Service
CERCLA: Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act
EPA: Environmental Protection Agency
IARC: International Agency for Research on Cancer
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
NIOSH: National institute for Occupational Safety and Health
NIST: National Institute of Standards and Technology
OSHA: Occupational Safety and Health Administration.
SEO: Sociedad Española de Oxígeno
WHO: World Health Organization

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades (Decreto 1257/74, de 25 de Abril de 1974, publicado en el BOE nº 110, del ocho de Mayo de 1974).

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura, numeración y nombres de los diez PAHs analizados (IUPAC, 1979).	4
Fig. 2. Espectro de masas del Antraceno.	7
Fig. 3. Espectro de UV del Antraceno.	8
Fig. 4. Espectro de masas del Fluoranteno.	9
Fig. 5. Espectro de UV del Fluoranteno.	10
Fig. 6. Espectro de masas del Pireno.	12
Fig. 7. Espectro de UV del Pireno.	12
Fig. 8. Espectro de masas del BaA.	13
Fig. 9. Espectro de UV del BaA.	14
Fig. 10. Espectro de masas del Criseno.	15
Fig. 11. Espectro de UV del Criseno.	15
Fig. 12. Espectro de masas del BbF.	17
Fig. 13. Espectro de UV del BbF.	17
Fig. 14. Espectro de masas del BkF.	19
Fig. 15. Espectro de UV del BkF.	19
Fig. 16. Espectro de masas del BaP.	21
Fig. 17. Espectro de UV del BaP.	21
Fig. 18. Espectro de masas del BghiP.	23
Fig. 19. Espectro de UV del BghiP.	23
Fig. 20. Espectro de masas del IndP.	25
Fig. 21. Espectro de UV del IndP.	25
Fig. 22. Posible mecanismo de formación de PAHs durante la combustión (Connell, 1997).	28
Fig. 23. Regiones de actividad en el BaP y Cris (Shaw y Connell, 1994; Gadzala y Buszewski, 1995).	33
Fig. 24. Fotografía del ratonero.	39
Fig. 25. Fotografía del cárabo.	41

Fig. 26. Fotografía de la lechuza.	44
Fig. 27. Diagrama de fases del CO ₂ .	47
Fig. 28. Diagrama de fases que muestra las regiones supercríticas y subcríticas del CO ₂ .	51
Fig. 29. Extractor de fluidos supercríticos HP7680A.	57
Fig. 30. Mapa de localización de las muestras analizadas.	105
Fig. 31. Módulo de extracción del HP7680A.	107
Fig. 32. Esquema básico del extractor supercrítico HP 7680A.	107
Fig. 33. Condiciones del SFE para realizar la extracción de PAHs.	108
Fig. 34. Lámpara UV: a) lámpara con viales vacíos, b) lámpara con viales llenos, c) vista lateral de la lámpara, d) vista inferior de la lámpara.	115
Fig. 35. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del tipo de víscera.	119
Fig. 36. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función de la especie.	120
Fig. 37. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del sexo.	120
Fig. 38. Cromatogramas de HPLC de sílica al 15% y alúmina al 10% en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	122
Fig. 39. Cromatogramas de HPLC de sílica al 15%, purificada seis horas por soxhlet con ACN SCHARLAU y MERCK, en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	124
Fig. 40. Pérdida de Antraceno por evaporación a sequedad por: a) espectrofluorimetría, b) HPLC-FL.	126
Fig. 41. Mapa de contorno de ACN MERCK y a) zoom de los espectros de emisión fijando la λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.	128
Fig. 42. Mapa de contorno de ACN SCHARLAU y a) zoom de los espectros de emisión fijando la λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.	128

Fig. 43. Mapa de contorno del Antraceno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 250 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 150 nm.	129
Fig. 44. Mapa de contorno del Fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 288 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 170 nm.	129
Fig. 45. Mapa de contorno del Pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 334 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40 nm.	130
Fig. 46. Mapa de contorno del Benzo[<i>a</i>]antraceno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 288 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ 100 nm.	130
Fig. 47. Mapa de contorno del Criseno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 270 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 95 nm.	131
Fig. 48. Mapa de contorno del Benzo[<i>b</i>]fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 300 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 145 nm.	131
Fig. 49. Mapa de contorno del Benzo[<i>k</i>]fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 307 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 105 nm.	132
Fig. 50. Mapa de contorno del Benzo[<i>a</i>]pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 296 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 110 nm.	132
Fig. 51. Mapa de contorno del Benzo[<i>ghi</i>]perileno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 298 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 110 nm.	133
Fig. 52. Mapa de contorno del Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 305 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 165 nm.	133

Fig. 53. Espectros de excitación y de emisión del Antraceno, Fluoranteno, Pireno y Benzo[<i>a</i>]antraceno en ACN.	134
Fig. 54. Espectros de excitación y de emisión del Criseno, Benzo[<i>b</i>]fluoranteno, Benzo[<i>k</i>]fluoranteno y Benzo[<i>a</i>]pireno en ACN.	134
Fig. 55. Espectros de excitación y de emisión del Benzo[<i>ghi</i>]perileno e Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno en ACN.	135
Fig. 56. Mapa de contorno de la sílica al 15% en ACN, purificada seis horas por soxhlet con ACN MERCK y a) zoom de los espectros de emisión fijando la λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.	135
Fig. 57. Mapa de contorno de una mezcla de los diez PAHs en ACN y a) zoom de los espectros de emisión fijando la λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.	136
Fig. 58. Mapa de contorno de una muestra de hígado comercial de pollo y a) zoom de los espectros de emisión fijando la λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.	136
Fig. 59. Sistema de mantenimiento de la columna de HPLC a temperatura constante.	138
Fig. 60. Anchuras características del pico cromatográfico del Antraceno.	141
Fig. 61. Anchuras características del pico cromatográfico del Fluoranteno.	141
Fig. 62. Anchuras características del pico cromatográfico del Pireno.	141
Fig. 63. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[<i>a</i>]antraceno.	142
Fig. 64. Anchuras características del pico cromatográfico del Criseno.	142
Fig. 65. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[<i>b</i>]fluoranteno.	142
Fig. 66. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[<i>k</i>]fluoranteno.	143

Fig. 67. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[<i>a</i>]pireno.	143
Fig. 68. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[<i>ghi</i>]perileno.	143
Fig. 69. Anchuras características del pico cromatográfico del e Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno.	144
Fig. 70. Rectas de calibrado del Antraceno, Pireno, Benzo[<i>a</i>]antraceno, Benzo[<i>k</i>]fluoranteno y Benzo[<i>a</i>]pireno en ACN, obtenidas por HPLC-FL en las condiciones de cuantificación.	147
Fig. 71. Rectas de calibrado del Fluoranteno, Criseno, Benzo[<i>b</i>]fluoranteno y Benzo[<i>ghi</i>]perileno en ACN, obtenidas por HPLC-FL en las condiciones de cuantificación.	147
Fig. 72. Cromatograma de HPLC de patrón de los diez PAHs en ACN en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	152
Fig. 73. Espectros sincrónicos del Antraceno en ACN (0.4, 1 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	153
Fig. 74. Espectros sincrónicos del Fluoranteno en ACN (3, 4 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	153
Fig. 75. Espectros sincrónicos del Pireno en ACN (0.5, 1 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	153
Fig. 76. Espectros sincrónicos del Benzo[<i>a</i>]antraceno en ACN (1, 3 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	153
Fig. 77. Espectros sincrónicos del Criseno en ACN (2, 3 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154
Fig. 78. Espectros sincrónicos del Benzo[<i>b</i>]fluoranteno en ACN (5 y 20 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154
Fig. 79. Espectros sincrónicos del Benzo[<i>k</i>]fluoranteno en ACN (1, 2 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154
Fig. 80. Espectros sincrónicos del Benzo[<i>a</i>]pireno en ACN (0.5, 1 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154

Fig. 81. Espectros sincrónicos del Benzo[ghi]perileno en ACN (2, 3 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154
Fig. 82. Espectros sincrónicos del Indeno[1,2,3- cd]pireno en ACN (30 y 35 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.	154
Fig. 83. Espectros sincrónicos de Antraceno, sílica y sílica sobrecargada con Antraceno en ACN realizados mediante HPLC-FL.	155
Fig. 84. Espectros sincrónicos de Pireno, sílica y sílica sobrecargada con Pireno en ACN realizados mediante HPLC-FL.	155
Fig. 85. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Antraceno y Antraceno en el pulmón de la muestra C-2 y en el hígado de la muestra R-8, realizados mediante HPLC-FL.	156
Fig. 86. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Fluoranteno y Fluoranteno en el músculo de la muestra L-8, realizados mediante HPLC-FL.	156
Fig. 87. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Pireno y Pireno en el intestino de la muestra R-8, realizados mediante HPLC-FL.	156
Fig. 88. Espectros sincrónicos en ACN de patrón Benzo[a]antraceno y Benzo[a]antraceno en intestino de la muestra L-11 y en el pulmón de las muestras L-10 y L-4, realizados mediante HPLC-FL.	156
Fig. 89. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs antes y después de ser sometido durante 16 h en lámpara UV a 254 nm en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	157
Fig. 90. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y del corazón de la muestra R-1 en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	162
Fig. 91. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y del hígado de la muestra L-3 en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.	163
Fig. 92. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra R-5 en: a) condiciones de inyección 1, b)	

condiciones de inyección 2, y c) espectro sincrónico de confirmación del Pireno.	165
Fig. 93. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra R-4.	166
Fig. 94. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra C-1 en: a) condiciones de inyección 1, b) condiciones de inyección 2, y c) espectro sincrónico de confirmación del Fluoranteno.	167
Fig. 95. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra C-1.	168
Fig. 96. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra L-7 en: a) condiciones de inyección 1, b) condiciones de inyección 2, c) espectro sincrónico de confirmación del Antraceno y d) espectro sincrónico de confirmación del Benzo[b]fluoranteno.	169
Fig. 97. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra L-5.	170
Fig. 98. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.	173
Fig. 99. Análisis de la varianza de Pireno y las distintas vísceras de la lechuga.	176
Fig. 100. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo y especie.	177
Fig. 101. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.	178
Fig. 102. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.	179
Fig. 103. Análisis de la varianza de Pireno y las cuatro provincias del ratonero.	180
Fig. 104. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.	183

Fig. 105. Análisis de la varianza de Pireno y las distintas vísceras.	184
Fig. 106. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo.	184
Fig. 107. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.	185
Fig. 108. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.	186
Fig. 109. Análisis de la varianza de Pireno y las cuatro provincias.	187



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. PAHs más usualmente formados en procesos de combustión.	27
Tabla 2. Evaluación carcinogénica de los diez PAHs analizados según IARC (Ware, 1994).	34
Tabla 3. Valores de temperatura y presión críticas de diferentes fluidos.	52
Tabla 4. Características de las muestras analizadas para la determinación de PAHs.	104
Tabla 5. Longitudes de onda de excitación óptimas (nm), $\Delta\lambda$ (nm) y n° sincron, para los diez PAHs analizados en ACN.	110
Tabla 6. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) utilizadas para la cuantificación de los diez PAHs analizados.	111
Tabla 7. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) utilizadas para la confirmación de los diez PAHs analizados.	113
Tabla 8. Relación de las áreas obtenidas en las longitudes de onda de cuantificación y confirmación para los PAHs.	113
Tabla 9. λ_{exc} y λ_{em} iniciales para realizar los espectros en modo sincron mediante HPLC-FL.	114
Tabla 10. Características de las 87 vísceras utilizadas para la determinación del % de grasa y humedad.	117
Tabla 11. Variables estadísticas del % de humedad y de grasa.	118
Tabla 12. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del tipo de víscera.	119
Tabla 13. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función de la especie.	119
Tabla 14. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del sexo.	120
Tabla 15. Características de los picos cromatográficos según la Farmacopea Europea (EP).	140

Tabla 16. Características de los picos cromatográficos según la Farmacopea Americana (USP).	140
Tabla 17. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) utilizados para la cuantificación de los diez PAHs en ACN por HPLC-FL.	145
Tabla 18. Rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los PAHs estudiados.	146
Tabla 19. LD y LQ del adsorbente extraído por SFE, obtenidos por HPLC-FL ($\lambda_{ex}= 250$ y $\lambda_{em}= 400$), en la señal interferente con el Ant y Pir.	148
Tabla 20. RSD% y %R obtenidos al someter seis veces el adsorbente sobrecargado con los 10 PAHs, al procedimiento experimental.	148
Tabla 21. RSD% y %R obtenidos al someter seis veces una muestra hígado de pollo sin sobrecargar y sobrecargada con los diez PAHs, al procedimiento experimental.	149
Tabla 22. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) utilizados para la confirmación de seis PAHs en ACN por HPLC-FL.	150
Tabla 23. Rectas de calibrado utilizadas para la confirmación de seis PAHs.	151
Tabla 24. Contenido de humedad (p/p), muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de ratonero.	159
Tabla 25. Contenido de humedad (p/p), muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de cárbano.	160
Tabla 26. Contenido de humedad (p/p), muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de lechuga.	160
Tabla 26 (Cont.). Contenido de humedad (p/p), muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de lechuga.	161
Tabla 27. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie ratonero.	171
Tabla 28. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie cárbano.	171
Tabla 29. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie lechuga.	172

Tabla 30. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.	173
Tabla 31. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo y especie.	176
Tabla 32. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.	178
Tabla 33. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.	179
Tabla 34. Variables estadísticas de los niveles totales de PAHs.	181
Tabla 35. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.	182
Tabla 36. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo.	184
Tabla 37. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.	185
Tabla 38. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.	185

INTRODUCCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) constituyen un grupo de micropolucionantes orgánicos, que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente (atmósfera, agua, suelo y alimentos), y cuya reconocida carcinogenicidad y mutagenicidad, los ha situado en las listas de polucionantes orgánicos prioritarios de la EPA (16 PAHs), siendo utilizados como bioindicadores del medio ambiente (Baumard y col., 1997; Berset y col, 1999).

Aparte de pequeñas cantidades de origen natural: geoquímico y biosintético (son sintetizados por algunas algas, bacterias y plantas superiores) (WHO, 1984; Gadzala y Buszewski, 1995), los PAHs tienen fundamentalmente origen antropogénico: calefacciones, generadores, procesos industriales, incineración de basuras, incendios forestales, emisiones de vehículos, pavimentos asfálticos y en general, todos los procesos de combustión y pirólisis de combustibles orgánicos fósiles (petróleo, carbón) (Lawrence, 1984; WHO, 1984; ATSDR, 1990; Holoubek y col. , 1990 a y b; Katiyar y col. , 1993). Esto hace que puedan encontrarse dichos compuestos en muy diferentes matrices medioambientales (carne, pescado, suelos, sedimentos, agua). Por esta razón, su detección ha sido un importante problema, que ha llevado a desarrollar métodos analíticos con una gran selectividad y sensibilidad.

Debido a su carácter altamente lipofílico, estos compuestos son acumulados en distintos organismos vivos, junto con otros polucionantes químicos. En este estudio se han determinado los niveles de diez PAHs (seleccionando los seis PAH utilizados como bioindicadores de la potabilidad del agua y cuatro de bajo peso molecular que habitualmente son encontrados por diferentes autores en estudios de material medioambiental), incluidos dentro de los dieciséis que la EPA selecciona por su interés, en vísceras de aves rapaces catalogadas de interés especial, procedentes de los cuatro Centros de Recuperación de Fauna Salvaje de Galicia, cuyos resultados pueden ser

utilizados para conocer la polución del medio ambiente en la Comunidad Autónoma Gallega.

1.1. NOMENCLATURA

La IUPAC, cita una serie de normas para la correcta nomenclatura de los PAHs (Sherma, 1993; IUPAC, 1979):

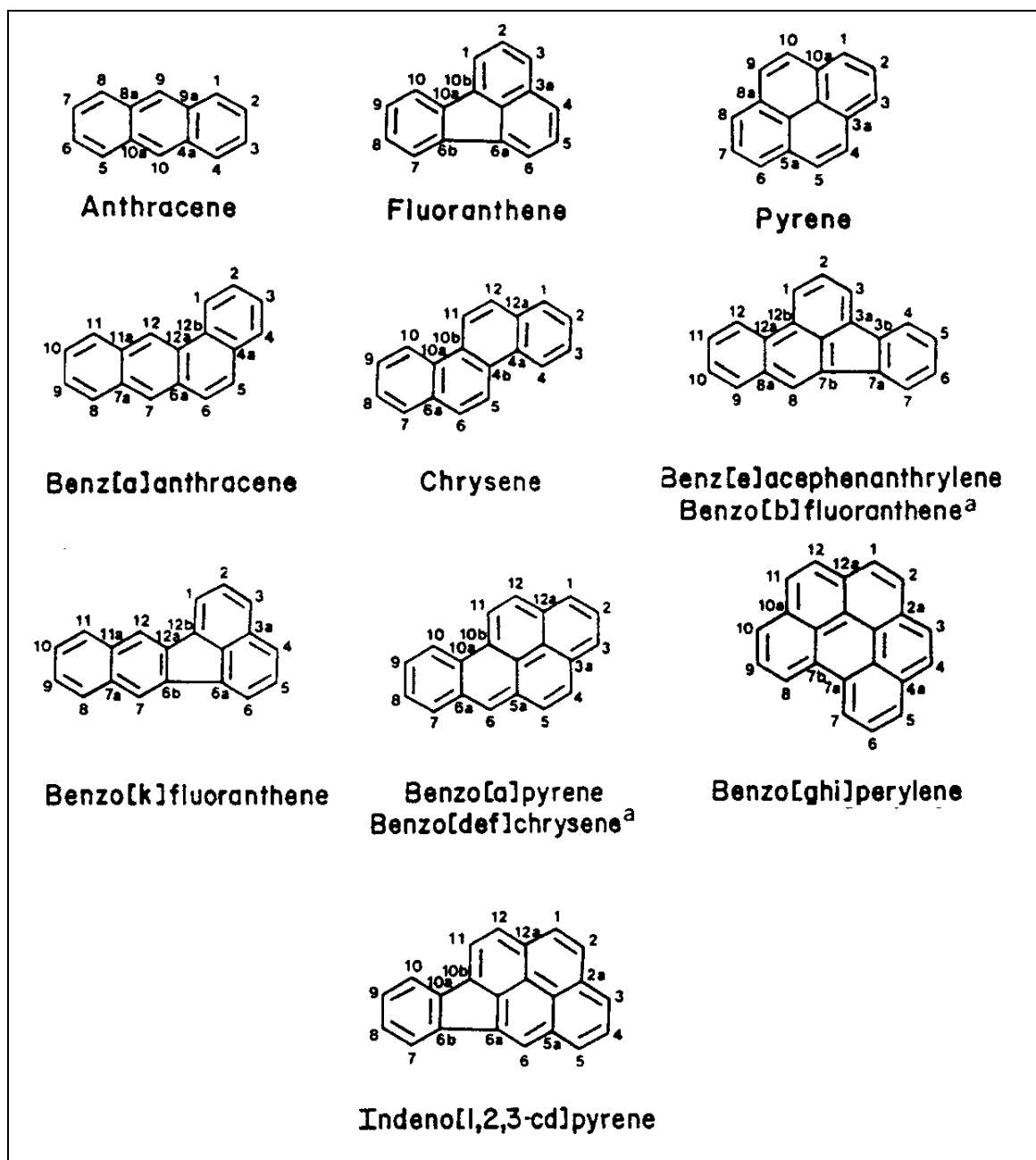
1. Los PAHs que contienen más de un anillo bencénico, unidos por átomos de carbono comunes, finalizan en –ene. Ej. : Anthracene, Fluoranthene y Chrysene...
2. Los nombres de los PAHs que contienen cinco o más anillos bencénicos condensados linealmente, se forman con el prefijo numérico correspondiente y la terminación –acene. Ej. : Pentacene, hexacene...
3. Otros PAHs que contienen al menos dos anillos de cinco o más componentes, unidos por dos átomos en común, y los cuáles no tienen un nombre común, se nombran precediendo al nombre por un componente del anillo. Ej. : Dibenzophenanthrene.
4. Los hidrocarburos polibencénicos condensados, sin nombre vulgar, se elige como componente principal aquel que contenga el máximo número de anillos y los componentes unidos a él han de ser lo más sencillos posibles, cambiando la terminación “-ene” del nombre del componente principal por “-eno” Ej. : “pyreno” (desde pyrene). Las siguientes abreviaturas son comúnmente reconocidas, Ej. : Anthra (Anthracene), Benzo (Benzene)...
5. A los enlaces del componente principal, o base, se les asignan las letras *a*, *b*, *c*, etc., empezando por “*a*” por el lado “1, 2”, “*b*” por el

“2, 3” (o en ciertos casos “2, 2a”) y escribiendo cada lado alrededor del periférico. Mientras que los componentes unidos a él se numeran normalmente. A la letra lo más baja posible del alfabeto, en la que tiene lugar la condensación del anillo base con el resto, se anteponen si es necesario los números de los puntos de unión del otro componente. Los números y letras se escriben entre corchetes, e inmediatamente después del componente correspondiente (Fig. 1).

Cuando sea necesario numerar el sistema policíclico, se orienta de manera que:

- El mayor número de anillos estén en línea horizontal.
- El mayor número de anillos quede en el cuadrante superior derecho. Si hay varias opciones se procura que quede el menor número posible de anillos en el cuadrante inferior izquierdo.
- Se numera en el sentido de las agujas del reloj, comenzando por un átomo de carbono (no condensado y contiguo a éste) de la posición más extrema del cuadrante superior derecho. No se numeran los átomos de carbono comunes.
- A los átomos comunes se les asigna el número inmediatamente anterior, seguido de las letras *a*, *b*,...
- Hay unas recomendaciones excepcionales para los siguientes compuestos: Anthracene, Phenantrene y Ciclopenta[*a*]phenantrene.

La Fig. 1. incluye la estructura de los diez PAHs analizados, con la correcta formulación y numeración, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC.



^a Segundo nombre prioritario según la IUPAC.

Fig. 1. Estructura, numeración y nombres de los diez PAHs analizados (IUPAC, 1979).

1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los PAHs comprenden una gran familia de hidrocarburos que contienen solo carbono e hidrógeno. Cada miembro está formado por dos o más anillos bencénicos fusionados, y en algunos casos un anillo pentagonal (Ej. : Fluoranteno), con o sin grupos sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrógeno, pudiendo presentar sobre su estructura átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno (Katiyar y col, 1993; Connell, 1997). Los PAHs de bajo Pm, se definen con dos o tres anillos aromáticos, y los de alto Pm con cuatro anillos o más.

La fluorescencia de los PAHs está relacionada con la presencia en su estructura de orbitales π -enlazantes de alta energía y de orbitales π^* -antienlazantes de energía inferior. La transición electrónica entre ambos tipos de orbitales es la que origina el color, y los espectros de absorción UV y de fluorescencia que los caracteriza (Shaw y Connell., 1994; Gadzala y Buszewski, 1995). Para su identificación también se pueden utilizar los espectros de masas.

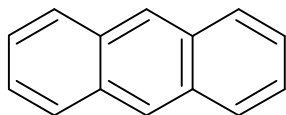
Los PAHs son usualmente sólidos, y el punto de fusión se incrementa al aumentar el Pm. Similarmente, el punto de ebullición aumenta al aumentar el Pm. Por tanto, al aumentar el Pm y el tamaño de la partícula, la solubilidad en agua y la presión de vapor disminuye. Estos factores condicionan su comportamiento medio ambiental, indicando que los PAHs de alto Pm son más persistentes en el medio ambiente, incrementándose también su toxicidad (Trapido y Vedre, 1996; Vander Kraan y Wingerden, 1996; Connell, 1997).

Debido a sus propiedades (químicas y físicas), especialmente los PAHs de alto Pm, tienden a acumularse en las diferentes matrices (Berset y col., 1999). Los rangos de vida media (DT_{50}), se estiman de 2 a 4 meses para el Fluoreno, de 8 a 14 meses para el Ant, de 5 a 10 meses para el Fl, de 4 a 8 meses para el Pir, de 7 a 13 meses para el BaA, de 8 a 13 meses para el Cri, de 1.9 a 3.4 años para el BbF, de 11 a 19 meses para el BkF, y de 1.5 a 2.7 años para el BaP (Van Brummelen y col., 1996a).

La liposolubilidad de un compuesto se puede representar por su coeficiente de partición n-octanol/agua (K_{ow}), de manera que al aumentar su valor aumenta la liposolubilidad, tendiendo a acumularse en la grasa de organismos vivos y sedimentos, y cuya extensión depende de su persistencia en el medio. Los PAHs de importancia ambiental presentan valores del log K_{ow} , en un rango comprendido de 2 a 6.5 (Tabla 1), por esto deben de ser clasificados como compuestos lipofílicos y con potencial de bioacumulación, lo cual tiene un marcado efecto al aumentar el peso molecular del compuesto, Ej.: BaP, compuesto de alto Pm, persistente, lipofílico, se debe esperar la bioacumulación (Connell, 1997).

A continuación se recogen la estructura, propiedades, espectros de absorción UV y de masas para cada uno de los diez PAHs analizados (ACD/ChemSketch, CHAPMAN & HALL, Masslab, HP ChemStation for LC and L/MS Systems).

Antraceno (Ant)



Molecular formula	= $C_{14}H_{10}$
Molecular Weight	= 178.229
Composition	= C(94.34%) H(5.66%)
Molar Refractivity	= $61.93 \pm 0.3 \text{ cm}^3$
Molar Volume	= $157.6 \pm 3.0 \text{ cm}^3$
Parachor	= $414.9 \pm 4.0 \text{ cm}^3$
Index of refraction	= 1.714 ± 0.02
Surface tension	= $47.9 \pm 3.0 \text{ dyne/cm}$
Density	= $1.130 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$
Dielectric Constant	= 3.08 ± 0.1
Polarizability	= $24.55 \pm 0.5 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^3$

Entry Name: Anthracene
 Chapman Hall Number: FQB14-U
 CAS Registry Number: 120-12-7
 Additional CAS Registry Number(s): 1719-06-8
 Type of Compound Code(s): PS8120

Molecular Formula: $C_{14}H_{10}$
 Molecular Weight: M 178.233.
 Source/Synthesis: Found in coal tar.
 Use/Importance: Dyestuff intermed. Reference material used in elemental microanalysis.
 Physical Description: Monoclinic plates (EtOH), colourless with violet fluor. When pure.
 Density: $d_{254} 1.283$.
 Melting Point: Mp 216.1 deg.
 Boiling Point: Bp 339.9 deg.
 Dissociation Constant: pKa -7.8 (H_2SO_4 aq.).
 Other Data: Strongly triboluminescent.
 Hazard Toxicity: >>>Fl. P. 121 deg, autoignition temp. 540 deg. Skin irritant and allergen.

RTECS Accession Number: >>CA9350000.

Supplier(s): Aldrich 14106-2; Fluka 10590; Rare Chemicals Library S44234-8; Sigma A3885; Supelco R42-3010.

Derivative: Trinitrotoluene complex

Chapman Hall Number: FQB15-V

CAS Registry Number: 29506-24-9

Melting Point: Mp 162 deg.

Derivative: Picrate

Chapman Hall Number: FQB07-U

CAS Registry Number: 17356-96-6

Physical Description: Dark red needles (CHCl₃).

Melting Point: Mp 138-139 deg.

Derivative: Trinitrobenzene complex

Chapman Hall Number: MJJ10-G

CAS Registry Number: 1700-13-6

Physical Description: Yellow needles (EtOH).

Melting Point: Mp 161-165 deg.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 48C (nmr)

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 961D (ir)

Aldrich Library of FT-IR Spectra: Vapor Phase, 1989, 3, 884C (ir)

Dumas, et al., Annalen, 1833, 5, 5 (isol)

Clar, E., Ber., 1932, 65, 506; 1939, 72, 1645 (uv, purifn)

Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Wiley, 1967, 1, 539; 1975, 5, 662; 1977, 6, 173 (use)

Beynon, J.H. et al., Org. Mass Spectrom., 1970, 3, 455 (ms)

Analyst (London), 1972, 97, 740 (microanal)

Agranat, T. Et al., Synthesis, 1974, 865 (synth)

Fleming, I. Et al., J.C.S. Perkin 1, 1975, 964 (synth)

Hansen, P.E. et al., Org. Magn. Reson., 1979, 12, 50 (cmr)

IARC Monog., 1983, 32, 105; Suppl. 7, 57 (rev, tox)

Brock, C.P. et al., Acta Cryst. B, 1990, 795 (cryst struct)

Patty's Ind. Hyg. Toxicol. (3rd Rev. Edn.), Vol. 2, Wiley, 1980, 3353

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, APG500

[00074094-8]

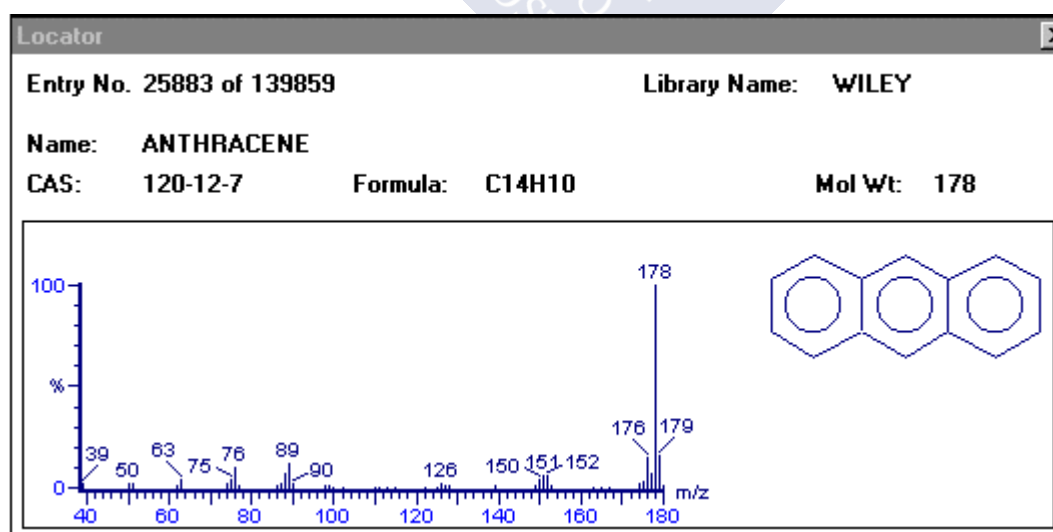


Fig.2. Espectro de masas del Antraceno.

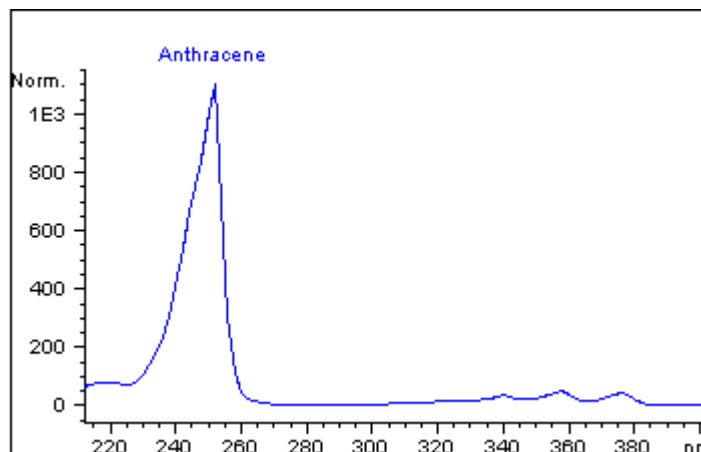


Fig. 3. Espectro de UV del Antraceno.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Sugelabor):

DATOS DE TOXICIDAD

- Sospechoso carcinógeno.
- Irrita la piel.

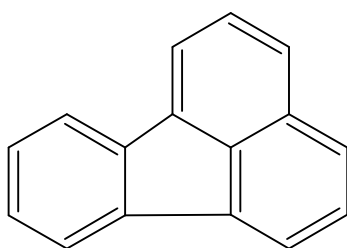
DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 217-218°C
 Color: azul
 Solubilidad en agua: insoluble, soluble en solventes orgánicos.
 Estable a 20°C.
 Sensible a la luz

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

Evitar contacto con la piel y ojos. No inhalar.
 Carcinógeno sospechoso

Fluoranteno (Fl)



Molecular formula = C₁₆ H₁₀
 Molecular Weight = 202.251
 Composition = C(95.02%) H(4.98%)
 Molar Refractivity = 67.02 ± 0.3 cm³
 Molar Volume = 164.7 ± 3.0 cm³
 Parachor = 450.5 ± 4.0 cm³
 Index of refraction = 1.748 ± 0.02
 Surface tension = 55.9 ± 3.0 dyne/cm
 Density = 1.227 ± 0.06 g/cm³
 Dielectric Constant = 3.35 ± 0.1
 Polarizability = 26.57 ± 0.5 10⁻²⁴ cm³

Entry Name: Fluoranthene, 9CI, 8CI

Synonym(s): 1,2-Benzacenaphthene. Benzo[jk]fluorene. Idryl. 1,2-(1,8-Naphthylene)benzene

Chapman Hall Number: BLK07-M

CAS Registry Number: 206-44-0

Type of Compound Code(s): VQ9000, VQ7700

Molecular Formula: C₁₆H₁₀

Molecular Weight: M 202.255.
 Source/Synthesis: Constit. of *Elsholtzia ciliata*.
 Use/Importance: Shows antiviral activity.
 Physical Description: Needles or plates (EtOH).
 Melting Point: Mp 110 deg.
 Boiling Point: Bp 384 deg. Bp 60 250-251 deg.
 Other Data: Warm conc. H₂SO₄ -> blue colour.
 Hazard Toxicity: >>LD50 (rat, orl) 2000 mg/kg. Mutagenic and carcinogenic props..
 RTECS Accession Number: >>LL4025000.
 Supplier(s): Aldrich 42394-7; Fluka 46530; Rare Chemicals Library S44235-6; Sigma F4418; Supelco 4-8535.

Derivative: Picrate
 Chapman Hall Number: BLK08-N
 CAS Registry Number: 55671-71-1
 Melting Point: Mp 184-185 deg.

Derivative: 1,3,5-Trinitrobenzene complex (1:1)
 Chapman Hall Number: BLK09-O
 CAS Registry Number: 55671-70-0
 Melting Point: Mp 208.5-209.4 deg.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 53C (nmr)
 Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 965C (ir)
 Aldrich Library of FT-IR Spectra: Vapor Phase, 1989, 3, 887D (ir)
 Meyer, R. et al., Ber., 1920, 53, 1261 (synth)
 v. Braun, J. et al., Ber., 1929, 62, 145 (synth)
 Orchin, M.T. et al., J.A.C.S., 1947, 69, 505 (synth, uv)
 Horwood Tucker, S. et al., Chem. Rev., 1952, 50, 483 (rev)
 Heffernan, M.L. et al., Aust. J. Chem., 1967, 20, 589 (pmr)
 Sasaki, T. et al., J.C.S. Perkin 1, 1974, 1213 (synth)
 Hazell, A.C. et al., Acta Cryst. B, 1977, 33, 1516 (cryst struct)
 Das Gupta, N.K. et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1978, 51, 1211 (uv)
 Shushan, B. et al., Org. Mass Spectrom., 1980, 15, 445 (ms)
 Maly, E., Monatsh. Chem., 1981, 112, 1103 (synth)
 Qui, Z.W. et al., J.A.C.S., 1982, 104, 2747 (cmr)
 Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press, 1991, 238
 Yip, L. et al., Planta Med., 1995, 61, 187 (isol, activity)
 Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, FDF000
 [00070739-0]

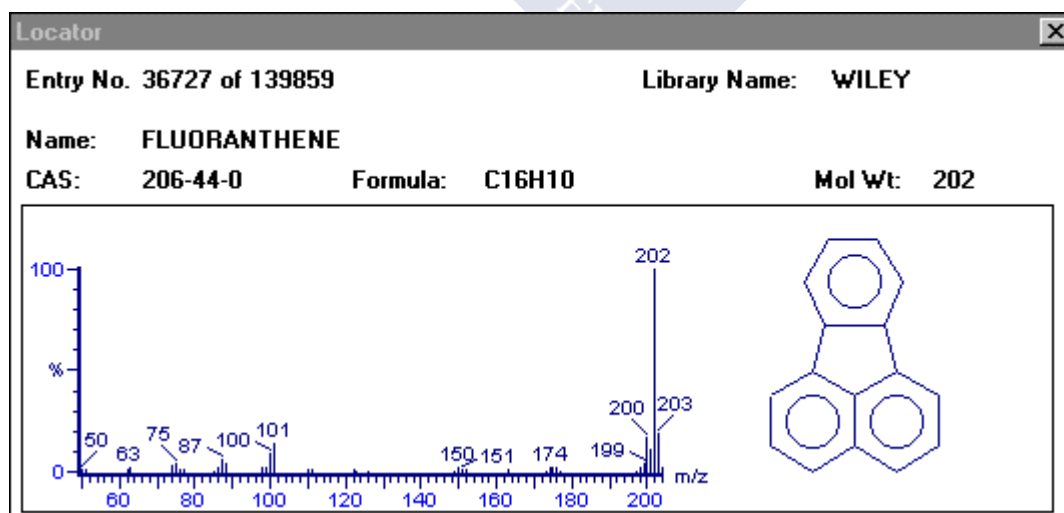


Fig. 4. Espectro de masas del Fluoranteno.

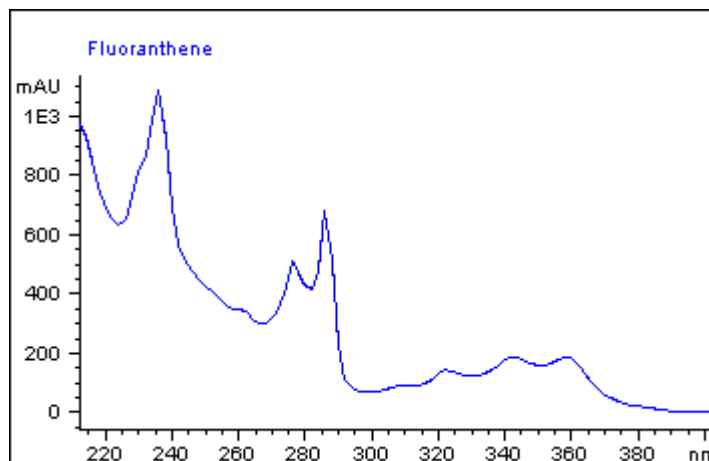


Fig. 5. Espectro de UV del Fluoranteno.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Aldrich):

DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 2000 mg/kg

-Ligeramente tóxico⁺

-Carcinogenicidad: OSHA: (NO) IARC: (YES) ACGIH: (NO) NIOSH: (NO) OTROS: (NO)

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 107-110°C

Punto de ebullición: 375°C

Densidad: 1.252

Presión de vapor: 0.01 mm@20C

Densidad de vapor: 7.0

Olor: inodoro

Color: amarillo pálido

Fase: sólido cristalino

Solubilidad en agua: insoluble (inmiscible)

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Medio de extinción: sin peligro de explosión o fuego

Límite inferior de explosión: 1%.

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Posible carcinógeno. Puede ser perjudicial inhalación, ingestión o absorción dérmica.

Puede causar irritación en los ojos. Puede causar irritación en la piel. Puede ser irritante para las membranas mucosas.

Posible mutágeno- Puede causar defectos de nacimiento en generaciones futuras.

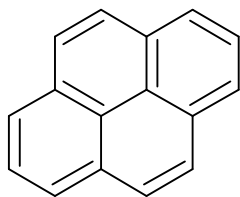
DATOS DE REACTIVIDAD

Combustible. Emite gases tóxicos en caso de incendio.

Productos de descomposición o combustión peligrosos: monóxido y dióxido de carbono.

Incompatible con agentes oxidantes fuertes. La descomposición libera vapores tóxicos.

Pireno (Pir)



Molecular formula	= C ₁₆ H ₁₀
Molecular Weight	= 202.251
Composition	= C(95.02%) H(4.98%)
Molar Refractivity	= 72.46 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 161.9 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 449.6 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.851 ± 0.02
Surface tension	= 59.4 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.248 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.41 ± 0.1
Polarizability	= 28.72 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Pyrene

Chapman Hall Number: FPS46-F

CAS Registry Number: 129-00-0

Molecular Formula: C₁₆H₁₀

Molecular Weight: M 202.255.

Source/Synthesis: Constit. of coal tar.

Use/Importance: Intermed. in synth. of Benzo[a]pyrene #FMP62-X.

Physical Description: Pale-yellow plates by subl..

Solubility: Sol. Et₂O, CS₂, C₆H₆, toluene.

Melting Point: Mp 149-150 deg.

Boiling Point: Bp 360 deg.

Dissociation Constant: pK_a -8.2 (H₂SO₄ aq.).

Other Data: Solns. show blue fluor..

Hazard Toxicity: >>Poss. carcinogen (theory predicts weak activity, no certain evidence). Skin irritant. LD₅₀ (rat, orl) 2700 mg/kg.

RTECS Accession Number: >>UR2450000.

Supplier(s): Aldrich 13159-8; Fluka 82650; Rare Chemicals Library S44354-9; Sigma P2146; Supelco R43-0780.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 55A (nmr)

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 967B (ir)

Elsevier's Encycl. Org. Chem., Ser. III, Vol. 14, 1940, 376

Baker, W. et al., Chem. Ind. (London), 1950, 77 (synth)

Saha, N.N. et al., J.O.C., 1955, 20, 1392 (synth)

Hansen, P.E. et al., Acta Chem. Scand., 1971, 25, 3377 (cmr)

Hazell, A.C. et al., Acta Cryst. B, 1972, 28, 2977 (cryst struct)

Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Wiley, 1974, 4, 414

Mullens, K., Helv. Chim. Acta, 1978, 61, 2307 (nmr)

Kimura, T. et al., J.O.C., 1978, 43, 1247 (synth)

IARC Monog., 1983, 32, 431; , Suppl. 7, 71 (rev, tox)

Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press, 1991, 174 (rev)

Sakamoto, Y. et al., Chem. Pharm. Bull., 1992, 40, 1991 (bibl, tox)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, PON250

[00073833-9]

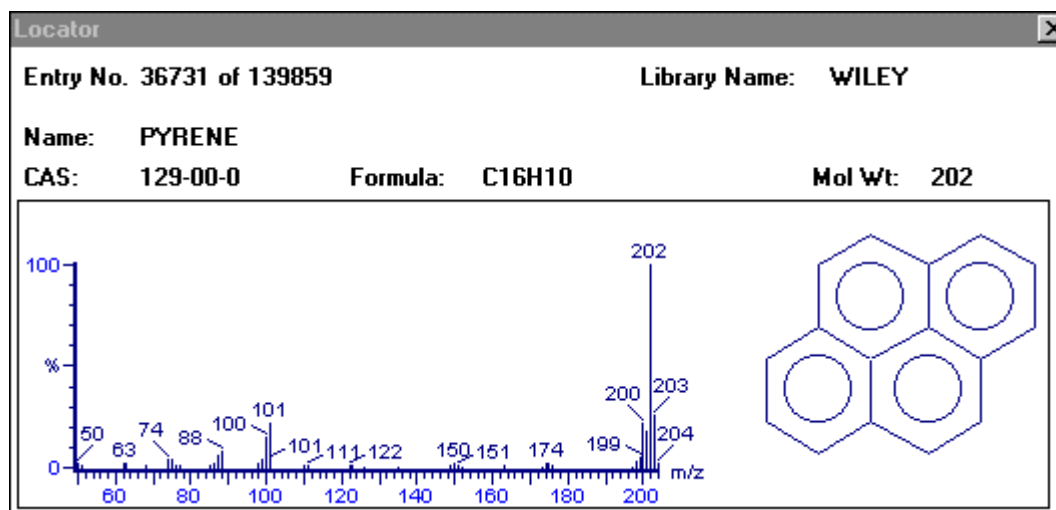


Fig. 6. Espectro de masas del Pireno.

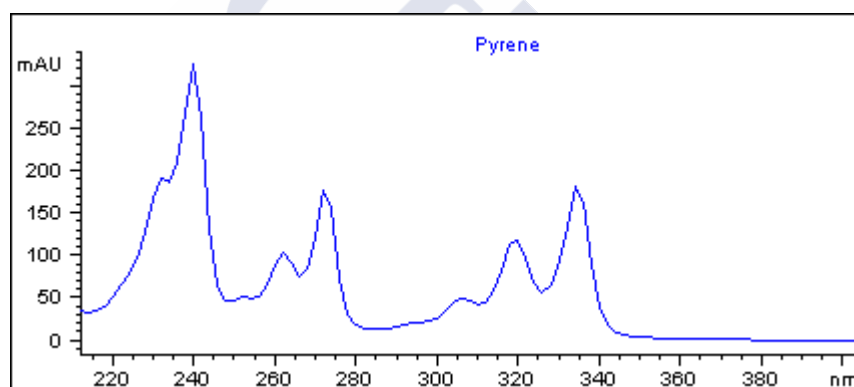
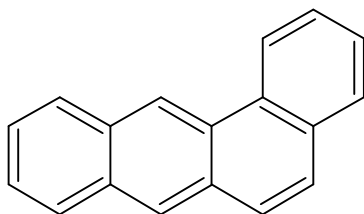


Fig. 7. Espectro de UV del Pireno.

Benzo[*a*]antraceno (BaA)

Molecular formula = C₁₈H₁₂
 Molecular Weight = 228.288
 Composition = C(94.70%) H(5.30%)
 Molar Refractivity = 79.78 ± 0.3 cm³
 Molar Volume = 191.7 ± 3.0 cm³
 Parachor = 518.7 ± 4.0 cm³
 Index of refraction = 1.771 ± 0.02
 Surface tension = 53.5 ± 3.0 dyne/cm
 Density = 1.190 ± 0.06 g/cm³
 Dielectric Constant = 3.24 ± 0.1
 Polarizability = 31.62 ± 0.5 10⁻²⁴ cm³

Entry Name: Benz[a]anthracene

Synonym(s): 1,2-Benzanthracene. Naphthanthracene. 2,3-Benzophenanthrene. Tetraphene. 1,2-Benzanthrene

Chapman Hall Number: FMM78-R

CAS Registry Number: 56-55-3

Molecular Formula: C₁₈H₁₂

Molecular Weight: M 228.293.

Physical Description: Leaflets (EtOH/AcOH).

Melting Point: Mp 158-159 deg.

Dissociation Constant: pK_a -7.5 (H₂SO₄ aq.).

Other Data: Sublimes. Sols. Fluor. Intense yellowish-green.

Hazard Toxicity: >>Probable human carcinogen. Exp. Weak carcinogen.

RTECS Accession Number: >>CV9275000.

Supplier(s): Aldrich B220-9; Fluka 12090; Rare Chemicals Library S43594-5; Sigma B2750; Supelco R43-0720.

Derivative: Picrate

Chapman Hall Number: FMM79-S

CAS Registry Number: 5928-81-4

Physical Description: Red needles.

Melting Point: Mp 133 deg.

References:

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 966^a (ir)

Aldrich Library of FT-IR Spectra: Vapor Phase, 1989, 3, 888^a (ir)

Aldrich Library of NMR Spectra, 2nd edn., 1983, 1, 769C (nmr)

Graebe, C., Annalen, 1905, 340, 249 (synth)

Badger, G.M. et al., J.C.S., 1939, 802 (synth)

Batterham, T.J. et al., Aust. J. Chem., 1966, 18, 1959 (nmr)

Mukherji, S.M. et al., Tetrahedron, 1967, 23, 3859 (synth, ir, uv)

Buchta, E. Et al., Annalen, 1968, 716, 102 (synth)

Mitra, A.K. et al., J. Indian Chem. Soc., 1971, 48, 391 (synth)

Newman, M.S. et al., J.O.C., 1979, 44, 1347 (synth)

Akiyama, I. Et al., J.A.C.S., 1981, 103, 6330 (pe)

IARC Monog., 1983, 32, 135; ,Suppl. 7, 58 (rev, tox)

Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press, 1991, 164 (rev)

Takeuchi, I. Et al., Chem. Pharm. Bull., 1993, 41, 747 (uv)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, BBC250

[00071378-8]

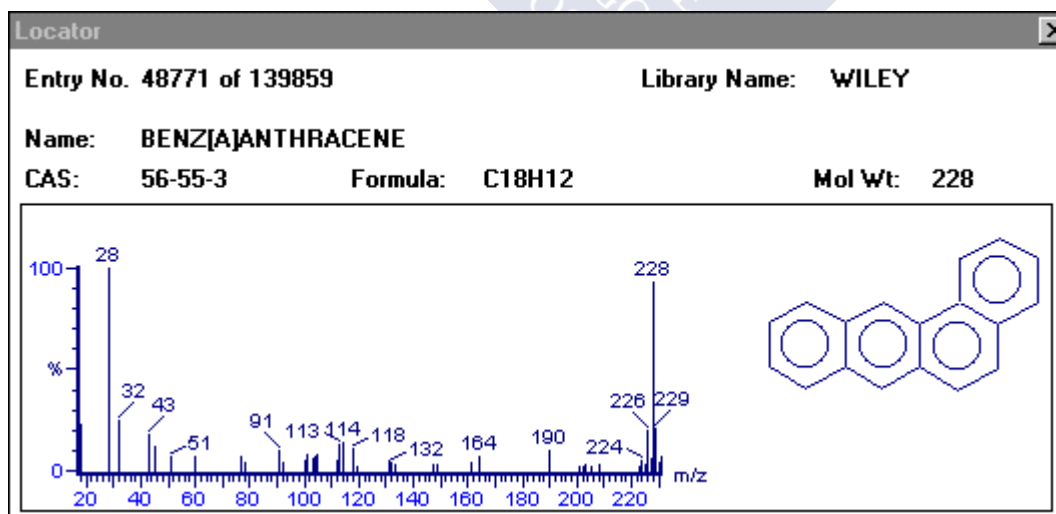


Fig. 8. Espectro de masas del BaA.

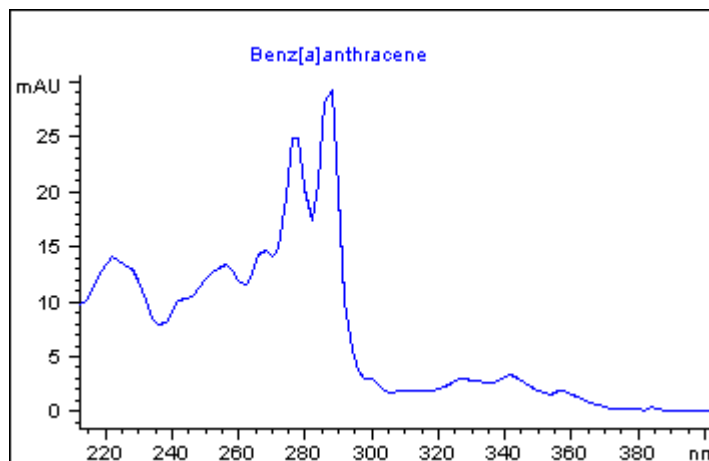
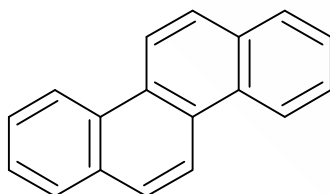


Fig. 9. Espectro de UV del BaA.

Criseno (Cri)



Molecular formula	= C ₁₈ H ₁₂
Molecular Weight	= 228.288
Composition	= C(94.70%) H(5.30%)
Molar Refractivity	= 79.78 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 191.7 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 518.7 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.771 ± 0.02
Surface tension	= 53.5 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.190 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.24 ± 0.1
Polarizability	= 31.62 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Chrysene, 9CI

Synonym(s): Benzo[a]phenanthrene. 1,2-Benzophenanthrene

Chapman Hall Number: FNB48-M

CAS Registry Number: 218-01-9

Molecular Formula: C₁₈H₁₂

Molecular Weight: M 228.293.

Physical Description: Plates (C₆H₆ or AcOH) with reddish-violet fluor..

Melting Point: Mp 255-256 deg.

Boiling Point: Bp 448 deg.

Hazard Toxicity: >>Human carcinogen, exp. carcinogen by skin contact.

RTECS Accession Number: >>GC0700000.

Supplier(s): Aldrich 24518-6; Fluka 27220; Sigma C6898; Supelco 4-8565.

References:

Aldrich Atlas of IR Spectra, 2nd Ed., 518 (ir)

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 966D (ir)

Jarrett, A.D. et al., J.C.S., 1955, 4052

Davies, W. et al., J.C.S., 1957, 4967 (synth)

Hunt, S.E. et al., J.C.S., 1958, 227 (uv)

Memory, J.D., J. Chem. Phys., 1966, 45, 3567 (pmr)

IARC Monog., 1983, 32, 247; ,Suppl. 7, 60 (rev, tox)

Jones, A.J. et al., Aust. J. Chem., 1984, 37, 561 (pmr, cmr)

Bax, A. et al., J.O.C., 1985, 50, 3029 (cmr, pmr)

Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press,

1991, 159 (rev)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, CML810

[00071962-X]

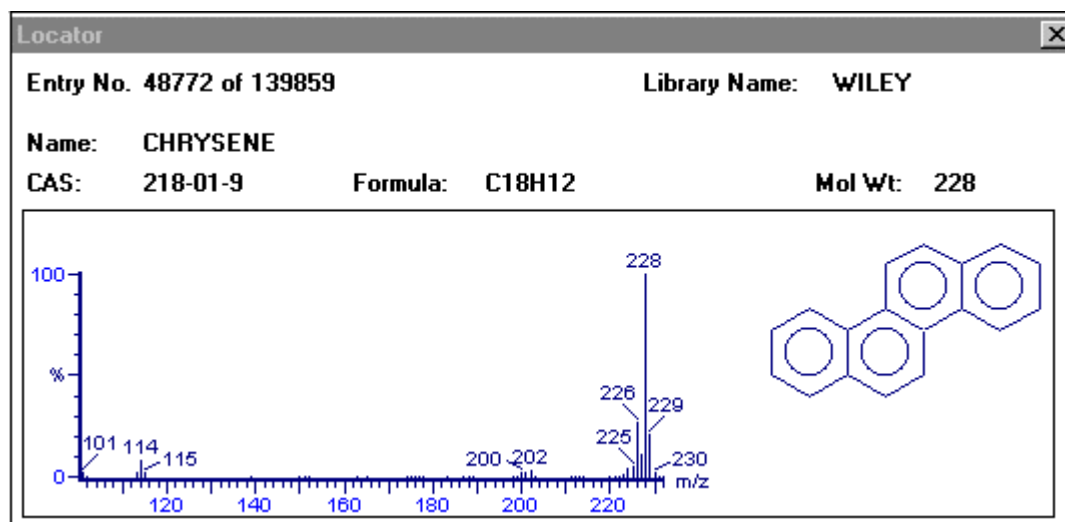


Fig. 10. Espectro de masas del Criseno.

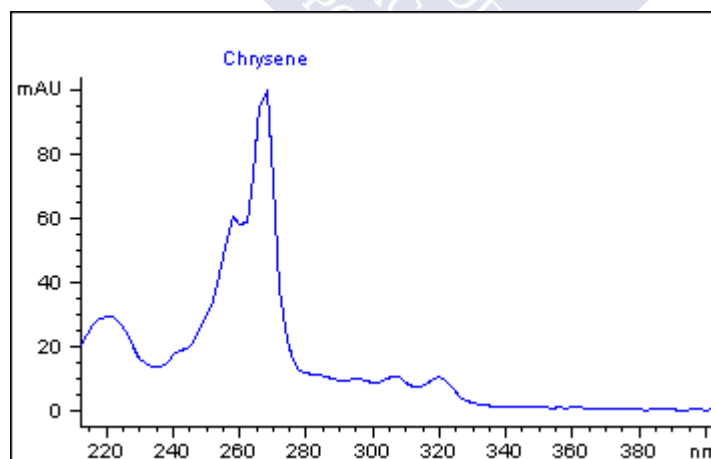
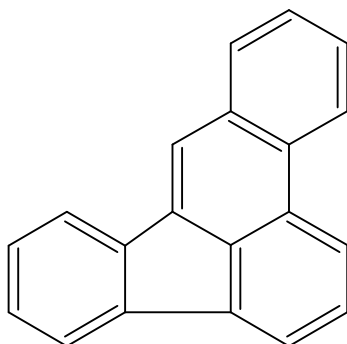


Fig. 11. Espectro de UV del Criseno.

Benzo[*b*]fluoranteno (BbF)

Molecular formula	= C ₂₀ H ₁₂
Molecular Weight	= 252.309
Composition	= C(95.21%) H(4.79%)
Molar Refractivity	= 84.86 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 198.8 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 554.3 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.798 ± 0.02
Surface tension	= 60.4 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.268 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.46 ± 0.1
Polarizability	= 33.64 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Benz[e]acephenanthrylene, 9CI
 Synonym(s): Benzo[*b*]fluoranthene, 3,4-Benzofluoranthene
 Chapman Hall Number: FMM92-R
 CAS Registry Number: 205-99-2

Molecular Formula: C₂₀H₁₂
 Molecular Weight: M 252.315.
 Physical Description: Needles (C₆H₆ or EtOH).
 Melting Point: Mp 168 deg.
 Hazard Toxicity: >>Possible human carcinogen. Exp. Carcinogen and neoplastic agent.
 RTECS Accession Number: >>CU1400000.
 Supplier(s): Aldrich 27533-6; Supelco R43-0740.

Derivative: Picrate
 Chapman Hall Number: FMM93-S
 Physical Description: Yellow needles (EtOH).
 Melting Point: Mp 156 deg.

Derivative: 1,3,5-Trinitrobenzene complex
 Chapman Hall Number: FMM94-T
 Physical Description: Orange-yellow needles (EtOH).
 Melting Point: Mp 179 deg.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 56^a (nmr)
 Tobler, R. Et al., *Helv. Chim. Acta*, 1941, 24, 100E (synth)
 Buu-Hoi, N.P. et al., *J.C.S.*, 1959, 1845 (synth)
 Bartle, K.D. et al., *Spectrochim. Acta A*, 1964, 25, 1603 (nmr)
 Lavitt Lamy, D. Et al., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1966, 2613 (uv)
 Jutz, C. et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1972, 11, 315 (synth)
 Jones, D.W. et al., *Spectrochim. Acta A*, 1974, 30, 489 (nmr)
 Brennan, J. et al., *J. Chem. Res., Synop.*, 1977, 107 (synth)
 Praefcke, K. et al., *Annalen*, 1978, 1399 (synth, ms)
 Amin, S. Et al., *J.O.C.*, 1981, 46, 2573 (synth, tox, bibl)
 IARC Monog., 1983, 32, 147; ,Suppl. 7, 58 (rev, tox)
 Anthony, I.J. et al., *Aust. J. Chem.*, 1984, 37, 1283 (synth)
 Chung, Y.-S. Et al., *J.O.C.*, 1987, 52, 1284 (synth, uv, pmr, ms)
 Cho, B.P. et al., *J.O.C.*, 1987, 52, 5668; ,5679 (synth, pmr, cmr)
 Lewis, R.J., *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, BAW250

[00071387-3]

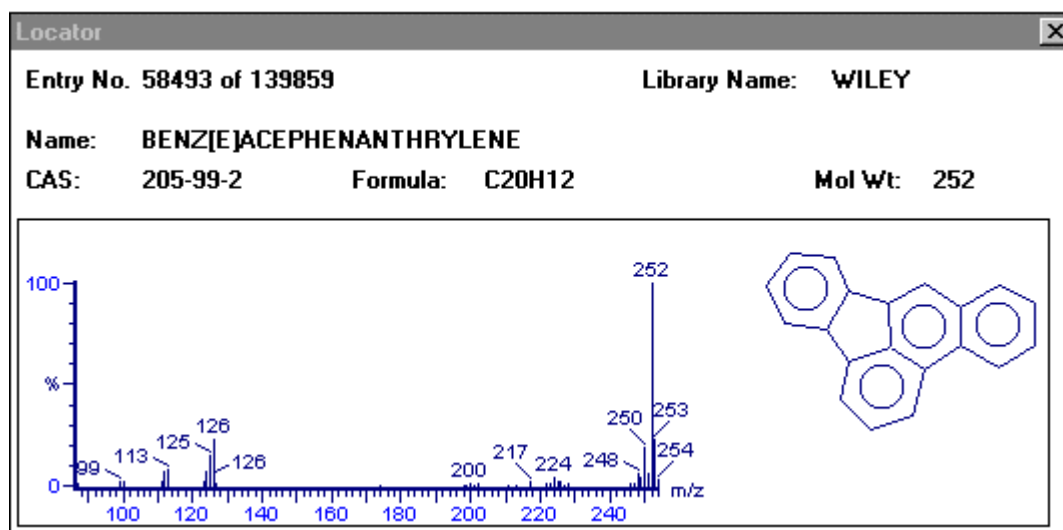


Fig. 12. Espectro de masas del BbF.

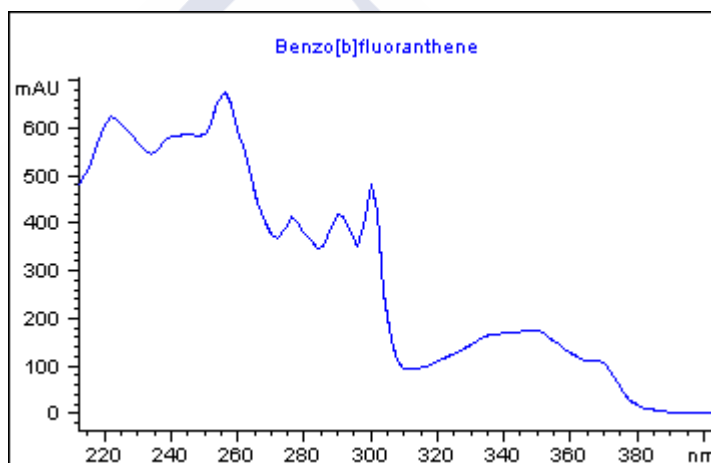


Fig. 13. Espectro de UV del BbF.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Sugelabor):

Otro nombre: 2,3-benzofluoranteno

DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 72 mg/kg

-Tóxico⁺

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 168°C

Fase: sólido cristalino

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

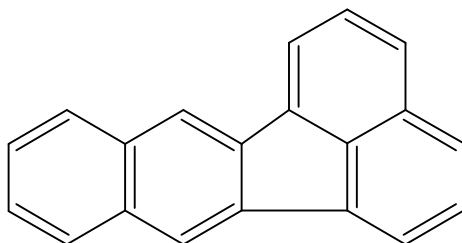
PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Carcinógeno sospechoso- Puede producir cáncer.

Benzo[k]fluoranteno (BkF)



Molecular formula	= C ₂₀ H ₁₂
Molecular Weight	= 252.309
Composition	= C(95.21%) H(4.79%)
Molar Refractivity	= 84.86 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 198.8 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 554.3 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.798 ± 0.02
Surface tension	= 60.4 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.268 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.46 ± 0.1
Polarizability	= 33.64 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Benzo[k]fluoranthene

Synonym(s): 11,12-Benzofluoranthene. 2,3;1',8-Binaphthylene. Dibenzo[b,jk]fluorene

Chapman Hall Number: HHB57-U

CAS Registry Number: 207-08-9

Molecular Formula: C₂₀H₁₂

Molecular Weight: M 252.315.

Source/Synthesis: Occurs in coal tar pitch.

Physical Description: Yellow prisms (C₆H₆ or AcOH).

Melting Point: Mp 217 deg.

Boiling Point: Bp 480 deg.

Hazard Toxicity: >>Exp. Carcinogen.

RTECS Accession Number: >>DF6350000.

Supplier(s): Aldrich 39225-1; Fluka 12488; Sigma B4042; Supelco R43-0750.

Derivative: Picrate

Chapman Hall Number: HBG75-H

Physical Description: Cryst..

Melting Point: Mp 170-171 deg.

Derivative: 1,3,5-Trinitrobenzene complex

Chapman Hall Number: FMN68-T

Melting Point: Mp 182 deg.

References:

Orchin, M. et al., J.A.C.S., 1951, 73, 436 (synth, uv)

Harris, A.S., Nature (London), 1952, 170, 461 (bibl)

Kruber, O. Et al., Chem. Ber., 1953, 86, 534 (synth)

Buu-Hoi, Ng.Ph. et al., J.C.S., 1959, 1845 (synth)

Whitlock, H.W., J.O.C., 1964, 29, 3129 (synth)

Bartle, K.D. et al., J. Mol. Spectrosc., 1967, 24, 330 (nmr)

Amin, S. Et al., J.O.C., 1981, 46, 2573 (tox, bibl)

IARC Monog., 1983, 32, 163; ,Suppl. 7, 58 (rev, tox)

Minsky, A. Et al., Synthesis, 1983, 497 (synth)

Papageorgiou, G. Et al., Annalen, 1989, 397 (synth)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, BCJ750

[00071430-3]

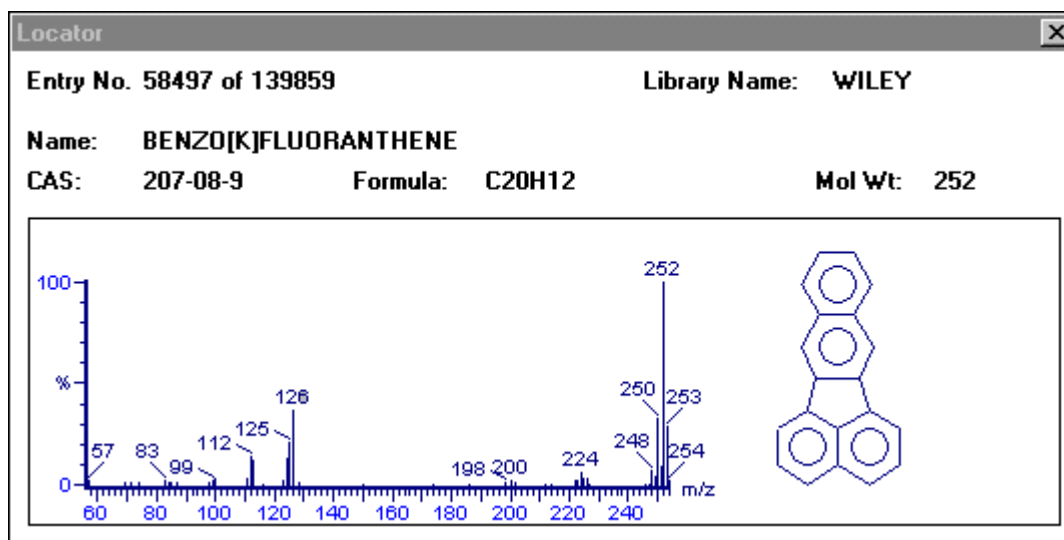


Fig. 14. Espectro de masas del BkF.

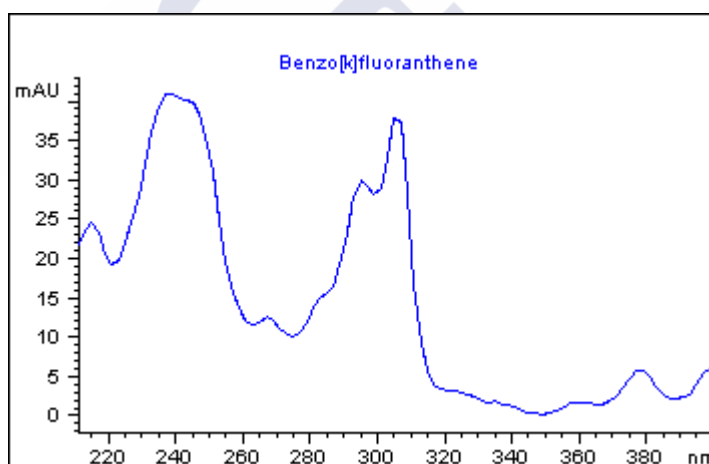


Fig. 15. Espectro de UV del BkF.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Sugelabor):

Otro nombre: 8,9-benzofluoranteno

DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 2820 mg/kg

-Ligeramente tóxico⁺

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 217°C

Punto de ebullición: 480°C

Color: amarillo pálido

Fase: sólido cristalino

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

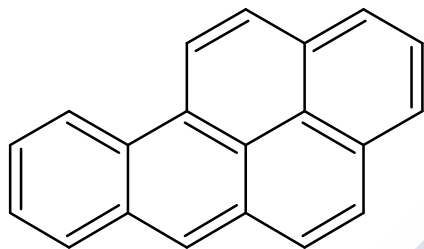
PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Carcinógeno sospechoso- Puede producir cáncer.

Benzo[a]pireno (BaP)



Molecular formula	= C ₂₀ H ₁₂
Molecular Weight	= 252.309
Composition	= C(95.21%) H(4.79%)
Molar Refractivity	= 90.30 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 196.0 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 553.5 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.887 ± 0.02
Surface tension	= 63.4 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.286 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.51 ± 0.1
Polarizability	= 35.80 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Benzo[a]pyrene, 9CI

Synonym(s): 3,4-Benzpyrene. 3,4-Benzopyrene. 1,2-Benzpyrene (obso.)

Chapman Hall Number: FMP62-X

CAS Registry Number: 50-32-8

Molecular Formula: C₂₀H₁₂

Molecular Weight: M 252.315.

Source/Synthesis: A principal carcinogenic const. Of coal tars, air pollution, etc..

Use/Importance: Extensively used in cancer research. Characteristic fluorescence spectrum; used as a marker for detn. Of polycyclic hydrocarbon residues, although it may not be the principal carcinogen.

Physical Description: Pale-yellow needles (C₆H₆/MeOH).

Melting Point: Mp 177 deg.

Boiling Point: Bp 10 310-312 deg.

Hazard Toxicity: >>Probable human carcinogen. Potent exp. Carcinogen and neoplastic agent. Skin irritant. Exp.

Reprod. And teratogenic effects.

RTECS Accession Number: >>DJ3675000.

Supplier(s): Aldrich B1008-0; Fluka 12780; Sigma B3500; Supelco R43-0730.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 57C (nmr)

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 969^a (ir)

Cook, J.W. et al., J.C.S., 1933, 395; ,398 (isol, synth)

Evans, D.F. et al., J.C.S., 1957, 1351 (uv)

Buchta, E. Et al., Annalen, 1968, 716, 102 (synth)

Bhatia, K., Anal. Chem., 1971, 43, 609 (glc)

Popp, F.A., Z. Naturforsch., C, 1973, 28, 165 (uv, tox)

Buchanan, G.W. et al., Can. J. Chem., 1975, 53, 1829

Shushan, B. Et al., Org. Mass Spectrom., 1980, 15, 445 (ms)

Unkefer, C.J. et al., J.A.C.S., 1983, 105, 733 (pmr, cmr)

Phillips, D.H., Nature (London), 1983, 303, 468 (rev)

Osborne, M.R. et al., Benzopyrenes, Cambridge University Press, Cambridge, 1987, (book)

Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press, 1991, 201 (rev)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, BCS750 [00071484-8]

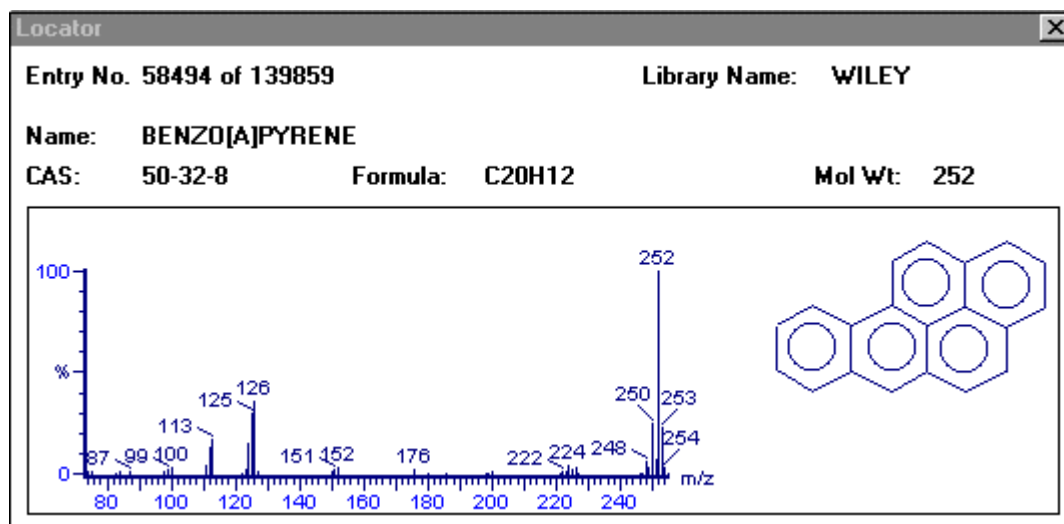


Fig. 16. Espectro de masas del BaP.

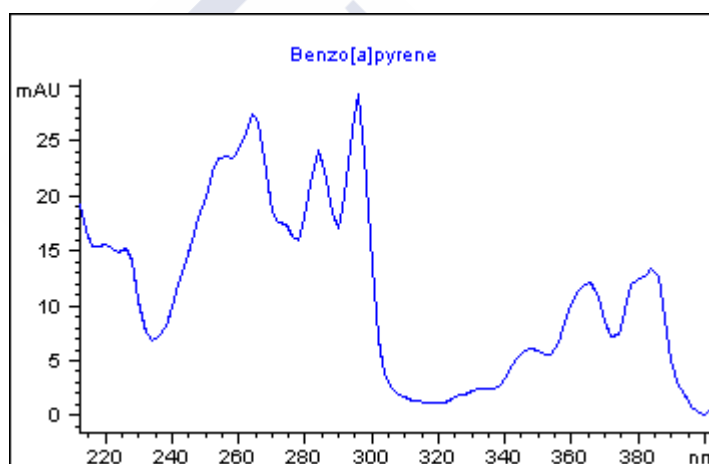


Fig. 17. Espectro de UV del BaP.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Aldrich):

DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 4095 mg/kg

-Ligeramente tóxico⁺

-Carcinogenicidad: OSHA: (NO) IARC: (NO) ACGIH: (YES) NIOSH: (NO) OTROS: (NO)

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 176,6-177,5°C

Punto de ebullición: 488-495°C

Color: amarillento

Fase: sólido cristalino

Solubilidad en agua: insoluble (inmiscible)

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

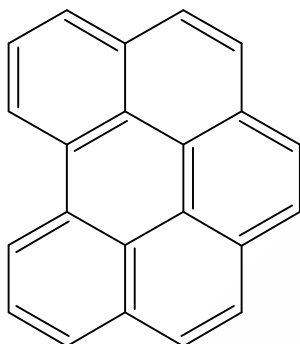
Carcinógeno sospechoso- Puede producir cáncer. Puede ser perjudicial si se absorbe a través de la piel. Puede ser perjudicial si se inhala. Puede ser perjudicial si se traga. Puede causar irritación en los ojos. Puede causar irritación en la piel. Polvo y/o vapores pueden causar irritación en el tracto respiratorio. Puede ser irritante para las membranas mucosas. Se puede absorber rápidamente a través de la piel con efectos potencialmente adversos para la salud.

DATOS DE REACTIVIDAD

Se absorbe y retiene con facilidad en ropas y/o calzado.

Incompatible con agentes oxidantes fuertes. La descomposición libera vapores tóxicos.

Benzo[ghi]perileno (BghiP)



Molecular formula	= C ₂₂ H ₁₂
Molecular Weight	= 276.331
Composition	= C(95.62%) H(4.38%)
Molar Refractivity	= 100.83 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 200.4 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 588.2 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 2.009 ± 0.02
Surface tension	= 74.2 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.378 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.77 ± 0.1
Polarizability	= 39.97 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Benzo[ghi]perylene, 9CI

Synonym(s): 1,12-Benzoperylene

Chapman Hall Number: FMP29-S

CAS Registry Number: 191-24-2

Molecular Formula: C₂₂H₁₂

Molecular Weight: M 276.337.

Source/Synthesis: Occurs in tar, smoke-polluted atmospheres and goose barnacles.

Physical Description: Yellowish-green fluor. Leaflets (C₆H₆).

Melting Point: Mp 272-273 deg.

Hazard Toxicity: >>Poss. Carcinogen (equivocal/insufficient data).

RTECS Accession Number: >>DI6200500.

Supplier(s): Aldrich B900-9; Fluka 12740; Sigma B6511; Supelco R43-0790.

References:

Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra, 1992, 2, 58C (nmr)

Aldrich Library of FT-IR Spectra, 1st edn., 1985, 1, 969C (ir)

Koe, B.K. et al., Arch. Biochem. Biophys., 1952, 41, 396 (occur)

Cooper, R.L., Chem. Ind. (London), 1953, 1364 (occur)

Ott, R. Et al., Monatsh. Chem., 1953, 84, 1132 (synth)

Aihara, J. et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1970, 48, 2435 (uv)

Matthews, R.S. et al., Spectrochim. Acta A, 1971, 27, 1185 (pmr)

Frycka, J., J. Chromatogr., 1972, 65, 432 (glc)

IARC Monog., 1983, 32, 195; ,Suppl. 7, 58 (rev, tox)

van Dijk, J.T.M. et al., J.O.C., 1996, 61, 1136 (synth)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, BCR000

[00071464-4]

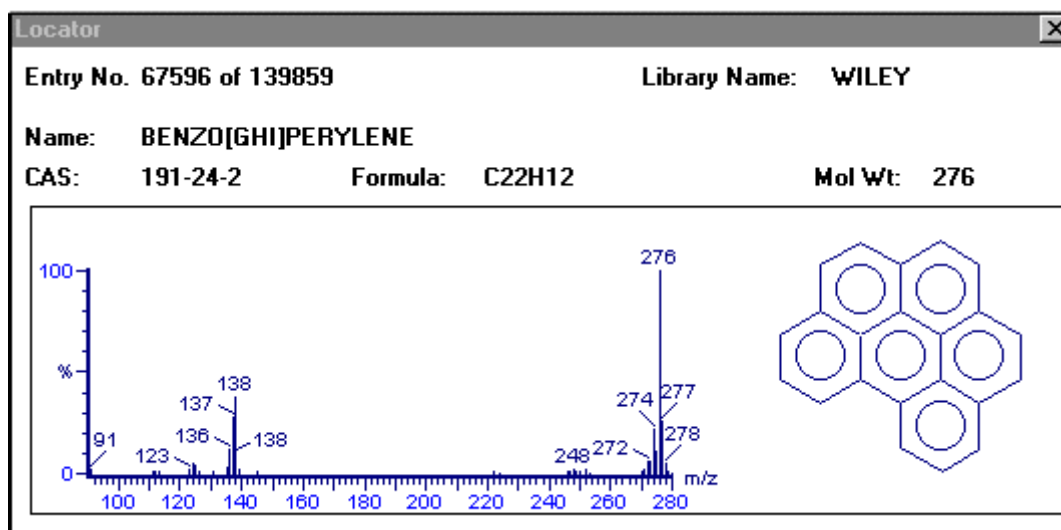


Fig. 18. Espectro de masas del BghiP.

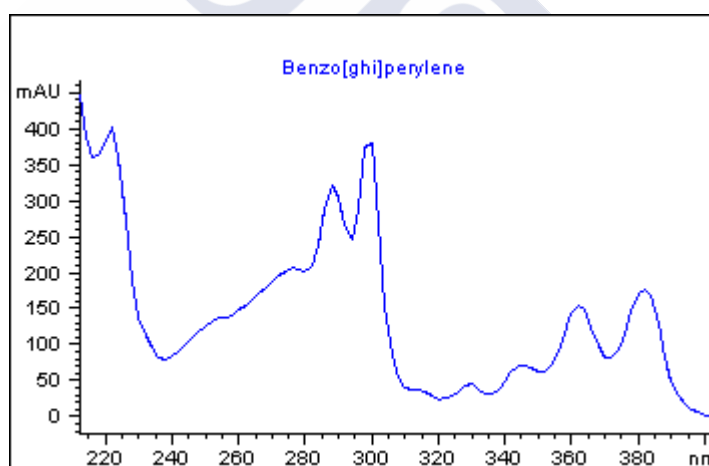


Fig. 19. Espectro de UV del BghiP.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Sugelabor):

DATOS DE TOXICIDAD

No se han encontrado datos de toxicidad. Se asume que es peligroso.

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 277-279°C

Punto de ebullición: >500°C

Color: amarillo

Fase: sólido cristalino

Solubilidad en agua: insoluble (inmiscible).

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

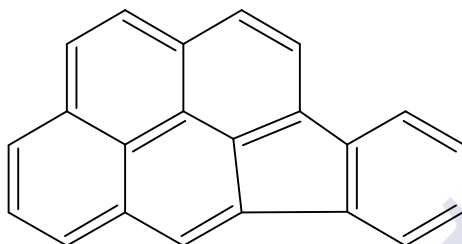
Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Puede ser fatal si se absorbe a través de la piel. Puede ser fatal si se inhala. Puede ser fatal si se traga.

Indeno[1,2,3-*cd*]pireno (IndP)

Molecular formula	= C ₂₂ H ₁₂
Molecular Weight	= 276.331
Composition	= C(95.62%) H(4.38%)
Molar Refractivity	= 95.39 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 203.1 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 589.1 ± 4.0 cm ³
Index of refraction	= 1.912 ± 0.02
Surface tension	= 70.7 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.360 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= 3.72 ± 0.1
Polarizability	= 37.81 ± 0.5 10 ⁻²⁴ cm ³

Entry Name: Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, 9CI

Synonym(s): 1,10-(1,2-Phenylene)pyrene

Chapman Hall Number: BLG60-D

CAS Registry Number: 193-39-5

Molecular Formula: C₂₂H₁₂

Molecular Weight: M 276.337.

Source/Synthesis: Component of industrial smog, cigarette smoke, car exhausts, etc..

Physical Description: Yellow cryst. (cyclohexane), bright-yellow plates (petrol/C₆H₆).

Melting Point: Mp 161-163.5 deg.

Other Data: Green-yellow fluor. In soln..

Hazard Toxicity: >>Possible human carcinogen. Exp. Carcinogen.

RTECS Accession Number: >>NK9300000.

Supplier(s): Rare Chemicals Library S45913-5; Supelco R43-0830.

References:

Aitkin, J.M. et al., J.C.S., 1956, 3487 (synth)

Studt, P., Annalen, 1978, 528 (synth)

IARC Monog., 1983, 32, 373; ,Suppl. 7, 64 (rev, tox)

Cho, B.P. et al., J.O.C., 1987, 52, 5668; ,5679 (synth, pmr, cmr)

Harvey, R.G., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity, Cambridge University Press, 1991, 250 (rev)

Lewis, R.J., Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8th edn., Van Nostrand Reinhold, 1992, IBZ000

[00070610-6]

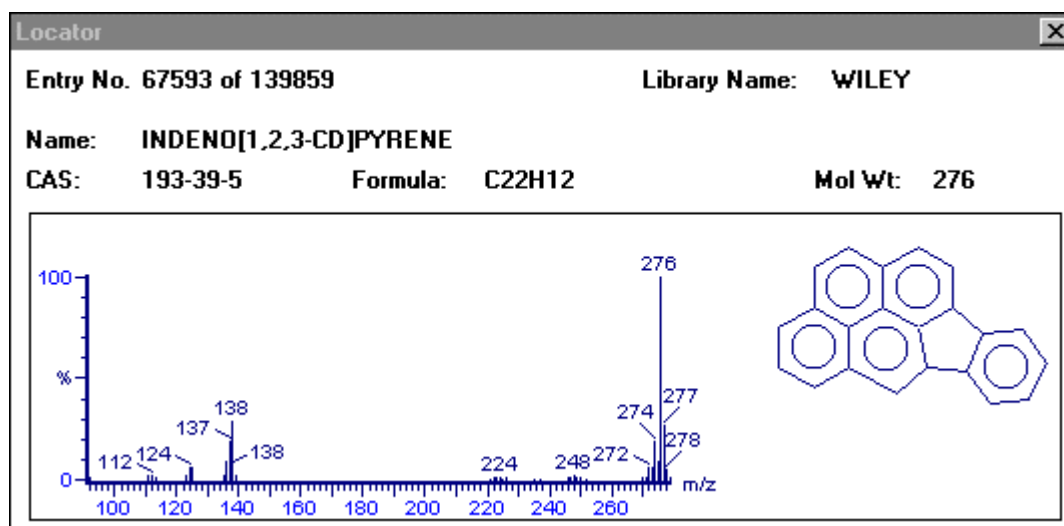


Fig. 20. Espectro de masas del IndP.

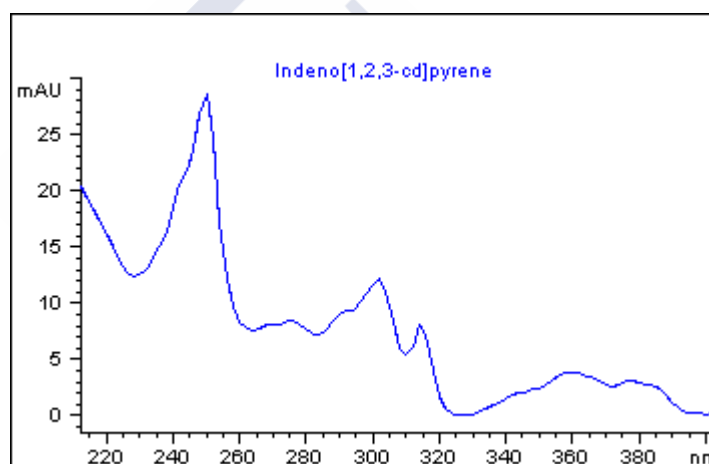


Fig. 21. Espectro de UV del IndP.

FICHA TÉCNICA (Datos suministrados por la casa comercial Sugelabor):

Otro nombre: 2,3-fenileno pireno

DATOS DE TOXICIDAD

Dosis letal 50 vía oral en ratas o ratones: 72 mg/kg

-Tóxico⁺

-Carcinogenicidad: OSHA: (NO) IARC: (NO) NTP: (YES) ACGIH: (NO) NIOSH: (NO)

OTROS: (YES).

DATOS FÍSICOS

Punto de fusión: 161-163°C

Punto de ebullición: 536°C

Presión de vapor: <0.1 mm@40 C

Color: amarillo

Fase: sólido cristalino

Solubilidad en agua: insoluble (inmiscible)

PELIGRO DE EXPLOSIÓN E INCENDIO

Punto de inflamación: 200+ C

Medio de extinción: dióxido de carbono, polvo seco o spray. No se disponen de límites de explosión para este compuesto.

PELIGROSIDAD PARA LA SALUD

No se deben de llevar lentes de contacto en el laboratorio.

Se deben considerar peligrosos todos los productos químicos- Evitar el contacto físico directo.

Carcinógeno sospechoso- Puede producir cáncer.

Basándose en la toxicidad de compuestos de estructura similar este material es con probabilidad altamente peligroso.

DATOS DE REACTIVIDAD

Baja reactividad. Incompatible con agentes oxidantes fuertes. Inflamable.

Incompatible con metales activos (por Ej. sodio).

1.3. ETIOLOGÍA

Básicamente, en todo proceso en que compuestos orgánicos sean calentados a elevada temperatura o se produzca su combustión de forma incompleta, se pueden originar PAHs. Por tanto, su origen puede ser natural (incendios) o antropogénico (combustión de automóviles, etc.). Sin embargo, las cantidades de PAHs procedentes de fuentes naturales son insignificantes comparadas con las cantidades generadas por la actividad humana (Gadzala y Buszewski, 1995; Connell, 1997).

1.3.1. FUENTES NATURALES

Las principales fuentes naturales de PAHs en el medio ambiente son las siguientes (Derache, 1990; Gadzala y Buszewski, 1995; ATSDR, 1996; Connell, 1997):

- Procesos de biosíntesis: la presencia de PAHs en alimentos no procesados se atribuye principalmente a la polución ambiental (Guillén, 1994).
- Reacciones geoquímicas: Un ejemplo típico es la transformación de la materia orgánica en petróleo, carbón y pizarras bituminosas.

Durante la formación geológica de gasolinas, se pueden originar por diferentes procesos. En la formación de carbón y petróleo, materiales biológicos se rompen bajo presiones y temperaturas moderadas (inferiores a 200°C), bajo estas condiciones, los PAHs se pueden formar por mecanismos similares a los implicados en combustiones incompletas.

A causa de las bajas temperaturas implicadas, las transformaciones ocurren más lentas.

- Procesos naturales de pirólisis: actividad volcánica e incendios forestales, son las más comunes.

1.3.2. FUENTES ANTROPOGÉNICAS

A altas temperaturas, superiores a 500°C, algunos enlaces C-C, C-H y otras uniones, se rompen para formar finalmente radicales libres. Dependiendo de la cantidad de oxígeno presente, algunos de estos fragmentos orgánicos reaccionan con otros radicales formando moléculas más complejas, como los PAHs (Fig. 22) (Connell, 1997).

Como consecuencia, se puede originar una gran variedad de PAHs en función de las condiciones que existan en la atmósfera. Las trazas de PAHs formados, también dependen de la temperatura de combustión y de la naturaleza del material orgánico. Sin embargo, independientemente del tipo de material quemado (celulosa, tabaco, poliestireno y otros materiales poliméricos), similares grupos de PAHs se forman a una temperatura determinada. Los PAHs recogidos en la Tabla 1, son los más comúnmente formados en procesos de combustión (Connell, 1997).

Tabla 1. PAHs más usualmente formados en procesos de combustión.

PAHs	Fórmula	Presión de vapor (kPa)	solubilidad en agua (mol/L)	log Kow
Ant	C ₁₄ H ₁₀	1,44*10 ⁻⁶	4,10*10 ⁻⁷	4,54
Fl	C ₁₆ H ₁₀	2,54*10 ⁻⁴	1,29*10 ⁻⁶	4,90
Pir	C ₁₆ H ₁₀	8,86*10 ⁻⁷	6,68*10 ⁻⁷	5,18
BaA	C ₁₈ H ₁₂	-----	6,14*10 ⁻⁸	5,61
BaP	C ₂₀ H ₁₂	6,67*10 ⁻¹³	1,51*10 ⁻⁸	6,04

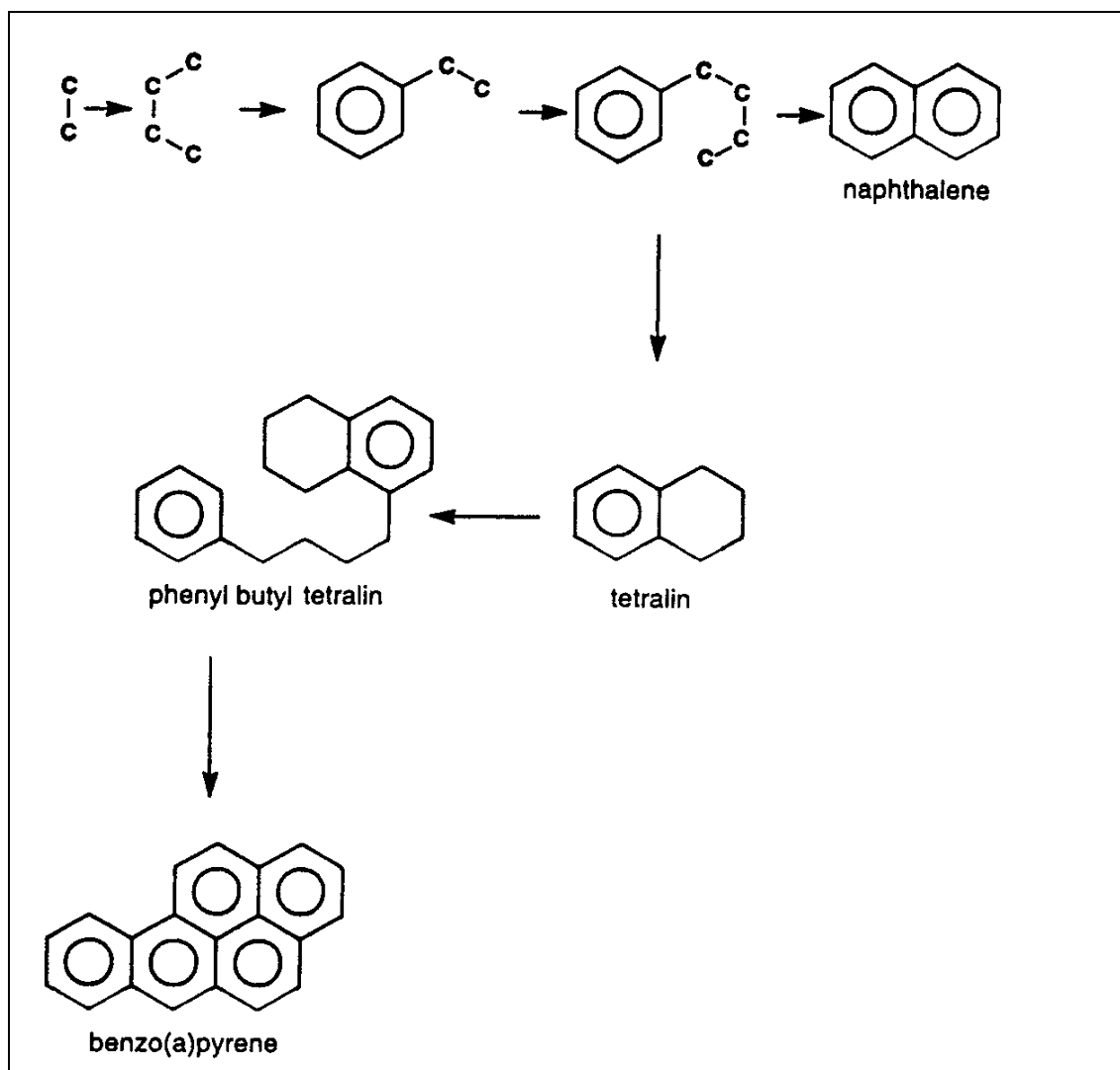


Fig. 22. Posible mecanismo de formación de PAHs durante la combustión. (Connell, 1997).

Las principales fuentes antropogénicas de los PAHs son (Derache, 1990; Gadzala y Buszewski, 1995; ATSDR, 1996):

- Industria: producción de alúmina, acero, asfalto, hierro, etc.
- Calefacciones: calderas de calefacción central, chimeneas, estufas de carbón, madera, gas, fuel-oil, etc.
- Incineraciones municipales e industriales, combustión de residuos, quema de rastrojos, praderas, etc.

- Transporte: vehículos de gasolina y diesel, abrasión de las llantas de los coches, etc.
- Accidentes: de especial interés los buques petroleros, en los que además del gran impacto ambiental que suponen, pueden producirse incendios en los que se generan cantidades elevadas de PAHs, como ocurrió en el buque "Aegean Sea", que naufragó en la ciudad de La Coruña en diciembre de 1992.
- Humo de tabaco.

1.4. OBTENCIÓN COMERCIAL

Los PAHs en Estados Unidos, solo son producidos por un único laboratorio químico. Sin embargo, los principales PAHs (Ant, Fl, Pir, Cri, etc.), compuestos sólidos que presentan diferentes colores (blanco, amarillo-verdoso, etc.) (ATSDR, 1996), se obtienen en el ámbito comercial a partir del alquitrán de hulla y del aceite de creosota, que se forma en los procesos de pirólisis del carbón bituminoso o hulla con un rendimiento del 3% con relación al peso original del carbón (Fieser y Fieser, 1966; ATSDR, 1990).

El primer componente aislado (1820), y el más abundante en el alquitrán, fue el Naftaleno (rendimiento medio con relación al peso del alquitrán próximo al 11%). Sin embargo, el que mayor interés tenía para los fabricantes era el Antraceno (aislado en 1832), por su importante valor como materia prima para la fabricación de la alizarina (el primer colorante natural que se preparó sintéticamente en 1868) y de los colorantes del grupo del Indantreno (1901).

La mayoría de los hidrocarburos restantes, al no presentar aplicaciones importantes, sólo unos pocos se utilizan en medicina, colorantes, plásticos y pesticidas (ATSDR, 1996), se obtienen en cantidades limitadas para la síntesis de laboratorio, y con altos costes, ya que la obtención de los mismos en estado puro implica numerosos y

complejos tratamientos (Karcher, 1985), no habiéndose desarrollado grandes tecnologías para su producción a mayor escala.

1.5. TOXICOLOGIA

El principal problema o inquietud de la presencia de PAHs en el medio ambiente, es su reconocida capacidad para producir cáncer en los organismos expuestos.

Es importante empezar definiendo tres conceptos toxicológicos que posteriormente van a ser utilizados para la clasificación toxicológica de los PAHs (Connell, 1997):

Teratógeno: "sustancias que causan defectos en el proceso de la reproducción".

Mutágeno: "sustancias que producen cambios hereditarios en el DNA del espermatozoides o del óvulo".

Carcinógeno: "sustancias que causan en las células pérdida de sensibilidad a factores que normalmente regulan su crecimiento y replicado. Cada célula replicada con una restricción, forma el crecimiento de una masa llamada *tumor*".

Un grupo de PAHs presentan una actividad carcinogénica fuerte en animales de experimentación (cáncer de piel), particularmente el BaA, BaP, BbF e IndP, y por lo tanto también pueden ser carcinógenos para el hombre; aunque en otros PAHs dicha actividad no está demostrada. Sin embargo, casi todos los PAHs son sospechosos de ser carcinógenos, aunque estos niveles puedan ser muy bajos (ATSDR, 1990; Connell, 1997). Estudios epidemiológicos ocupacionales de cánceres de piel, han proporcionado una fuerte evidencia presuntiva del papel positivo de los PAHs en ciertos tipos de cáncer humano (Fawell y Hunt, 1988), y otros ensayos realizados con sistemas bacterianos y líneas celulares en "vitro" e "in vivo", han evidenciado el carácter mutagénico de algunos de ellos (WHO, 1984).

Por lo que se refiere a la teratogenicidad de los PAHs, los datos de los que se disponen son escasos, pero los que se tienen del BaP, indican que estos efectos ocurren solamente a dosis comparativamente altas.

Es aceptado, que prácticamente todos los carcinógenos son mutágenos, pero no todos los mutágenos son carcinógenos (Shaw y Connell, 1994; Ware, 1994).

No es mucha la información que se dispone sobre la toxicidad aguda, subaguda y crónica de los PAHs después de su ingestión. No obstante, se ha comprobado que los PAHs causan hiperqueratosis, hiperplasias y pérdidas de glándulas sebáceas en la piel, y que algunos como el 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno, tiene un marcado efecto en la médula ósea y en el tejido linfóide (suprimen o reducen la respuesta inmunitaria) (Borget y col, 1993). Los síntomas que evidencian fenómenos de toxicidad no suelen aparecer hasta que la dosis es la suficiente para originar tumores (WHO, 1984).

1.5.1 REVISION HISTORICA

En 1775, Sir Percival Pott, cirujano inglés, observa cáncer de escroto en los deshollinadores, cuyo agente causal era el hollín (Fabre y Truhaut, 1976; Katiyar y col., 1993, Sherma, 1993). Como resultado de este descubrimiento, se estudiaron los efectos biológicos del alquitrán de hulla. El Dibenzo[*a,h*]antraceno fue el primer compuesto (sintetizado en 1930), en el que se encontró actividad carcinogénica. En 1933, se aisló a partir del alquitrán de hulla, el BaP, compuesto químico que exhibía una alta actividad cancerígena, y que era, al igual que en el caso anterior, un hidrocarburo aromático de cinco ciclos. A partir de entonces, numerosos estudios permitieron confirmar las propiedades carcinogénicas de algunos PAHs, subproductos de la combustión incompleta de combustibles orgánicos fósiles, tales como el carbón, y de otros que fueron obtenidos más tarde sintéticamente (Katiyar y col., 1993, Sherma, 1993).

Entre los cánceres profesionales de origen químico descritos posteriormente, hay que destacar sobre todo los cánceres de piel que aparecen en los obreros que manipulan ciertos productos de la hulla, y en particular, los alquitranes y sus residuos de

destilación (breas), o incluso ciertos productos pesados de la destilación de los petróleos crudos, y en especial, las parafinas (cánceres de los parafinadores) y de los aceites pesados (cánceres de los refinadores de petróleo) (Fabre y Truhaut, 1976).

La actividad cancerígena no es patrimonio exclusivo de los compuestos del grupo de los hidrocarburos aromáticos altamente condensados, pero hay que resaltar que es precisamente en este grupo en el que se encuentran los agentes cancerígenos más activos (Fabre y Truhaut, 1976).

1.5.2 ACTIVACIÓN METABÓLICA

Conocida su alta liposolubilidad, los PAHs sufren una rápida absorción a través del intestino y/o pulmones, y se distribuyen vía sanguínea o hepática a una gran variedad de tejidos, con una particular tendencia a localizarse en el tejido adiposo. Esta tendencia, sin embargo, no es muy manifiesta debido a su rápido metabolismo, como consecuencia de la cual se forman metabolitos, que pueden ser carcinógenos, y que son eliminados principalmente en la orina y las heces como compuestos hidrosolubles (WHO, 1987; Fawell y Hunt, 1988).

El metabolismo de los PAHs se produce vía citocromo P-450 dependiente del sistema enzimático presente en el retículo endoplasmático de las células de los mamíferos y más abundantemente en el hígado, e incluye como primeras etapas la oxidación o la hidroxilación (Shaw y Connell, 1994; Gadzala y Buszewski, 1995; Connell, 1997). Los epóxidos o fenoles resultantes pueden sufrir detoxificación y producir glucoronidos, sulfatos o conjugados con el glutatión. Algunos de los epóxidos formados pueden, a su vez, ser metabolizados a dihidrodioles, los cuales pueden experimentar conjugación para formar productos de detoxificación solubles, o bien, oxidación dando diol-epóxidos. Estos últimos compuestos son considerados los carcinógenos "últimos" en los casos que se observa la carcinogenicidad (WHO, 1984).

Los carcinógenos "últimos" son los metabolitos reactivos con capacidad para construir enlaces covalentes con macromoléculas e iniciar la respuesta carcinogénica. Sus precursores metabólicos inmediatos se denominan carcinógenos "próximos". La mayoría de los carcinógenos, especialmente los PAHs, son en sí mismos químicamente inertes; en su estructura está presente la información de la actividad carcinogénica, pero para llegar a ser reactivos, deben ser activados metabólicamente. La relación estructura-actividad de los carcinógenos órgano-químicos está basada en la naturaleza electrofílica de los mismos, o bien, de alguno de sus metabolitos. La formación de enlaces covalentes con centros nucleofílicos de macromoléculas biológicas, como el ARN, las proteínas, y especialmente el ADN, es el proceso llave de la carcinogénesis química (Borgert y col., 1993; Katiyar y col., 1993).

De entre todos los PAHs, el mejor estudiado, por lo que se refiere al mecanismo de metabolización, es el BaP. Administrado por vía oral, se absorbe en gran proporción para ser posteriormente metabolizado. Los numerosos productos de excreción urinaria, y sobre todo biliar y fecal, son dihidrodioles, fenoles y quinonas libres y conjugadas (especialmente el glutatión y al ácido glucurónico) (Katiyar y col., 1993).

Las regiones estructurales características de las moléculas de PAHs que se consideran responsables de la actividad de estos compuestos, denominadas región "bay", región "K" y región L, aparecen representadas en la Figura 23 (Shaw y Connell, 1994; Gadzala y Buszewski, 1995).

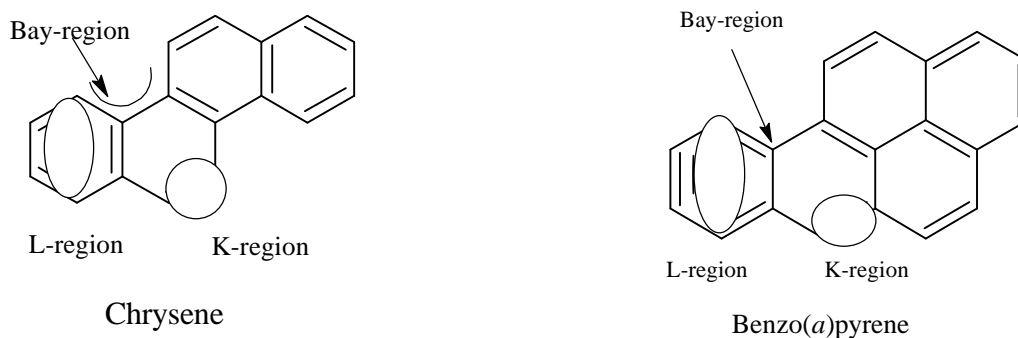


Fig. 23. Regiones de actividad en el BaP y Cris (Shaw y Connell, 1994; Gadzala y Buszewski, 1995).

Los PAHs por tanto, pueden ser sus propios inductores (Ayrton y col., 1990), pero también pueden tener una función inhibidora. Asimismo, los PAHs que carecen de propiedades mutágenas y cancerígenas pueden, en cambio, actuar como co-cancerígenos cuando se aplican simultáneamente con sus homólogos cancerígenos.

Como conclusión tenemos que la vía de administración, la dosis administrada, los parámetros fisiológicos y nutricionales, y en especial la presencia simultánea de inductores o inhibidores metabólicos, tienen una función determinante en la expresión de la actividad biológica de estas sustancias (Bories, 1990).

En la Tabla 2 se recoge una evaluación carcinogénica de los diez PAHs analizados según IARC (Ware, 1994):

Tabla 2. Evaluación carcinogénica de los diez PAHs analizados según IARC (Ware, 1994).

PAHs	Evidencia de carcinogenicidad ^b	Evaluación ^c
Ant	I	3
Fl	I	3
Pir	I	3
BaA	S	2A
Cri	L	3
BbF	S	2B
BkF	S	2B
BaP	S	2A
BghiP	I	3
IndP	S	2B

^b: Para humanos no hay datos evaluables. Para animales: I, evidencias inadecuadas; L evidencias limitadas; S evidencias suficientes.

^c: 1, carcinogénico en humanos; **2A** probablemente carcinogénicos en humanos; **2B** posiblemente carcinogénico en humanos; 3 no se clasifica como carcinogénico en humanos; 4 probablemente no es carcinogénico en humanos.

1.6 CONTROL

La población en general, está expuesta a los PAHs desde fuentes medioambientales como el aire, agua, suelo, humo del tabaco, así como desde alimentos (ATSDR, 1990).

En el medio ambiente, se estima una producción anual en el mundo del orden de 1000 Tm sólo para el BaP, en estudios realizados en los años 80 (Alloway y Ayres, 1993). En los últimos años el número y la intensidad de los procesos de combustión se han visto incrementados de forma alarmante por los numerosos incendios forestales, y concretamente en Galicia, no podemos omitir el desastre del petrolero Aegean Sea.

El Real Decreto 833/1988 de 20 de Julio (BOE, 30 de Julio de 1988), modificado por el Real Decreto 952/1997 de 20 de Junio (BOE, 5 de Julio de 1997), incluye a los PAHs dentro de los residuos que en función de la cantidad, concentración y forma de presentación, le pueden dar carácter de tóxico y peligroso, con los números de código C-43 para los PAHs, considerados como productos carcinógenos (H7), tóxicos para la reproducción (H10), mutagénicos (H11) y peligrosos para el medio ambiente (H14), que pueden ser generados durante la eliminación de residuos, entre otros orígenes.

La Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ha fijado un límite de 0.2 mg de PAHs/m³ de aire. El límite de exposición máximo permisible por la OSHA para aceite mineral es de un promedio de 5 mg de PAHs/ m³, durante un período de 8 horas de exposición (ATSDR, 1996).

El National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), recomienda un valor medio en el aire de los lugares de trabajo, para los trabajadores que están en contacto con alquitrán de hulla, que no supere 0.1 mg de PAHs/m³ de aire, en una jornada de 10 horas diarias o 40 horas semanales, sin especificar un límite para el BaP (ATSDR, 1996).

La ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) incluye en su lista prioritaria de 20 sustancias más peligrosas dos PAHs, el BaP (nº 8) y el BbF (nº 9), como posibles carcinógenos, y los PAHs en general (nº 10) (1995).

La CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act), presenta una lista preparada por la ATSDR y la EPA de 275 sustancias peligrosas por orden de prioridad, de las que más comúnmente se encuentran en las NPL (National Priorities List), y que son aquellas que poseen mayor potencial de riesgo para la salud humana, debido a su sospechosa toxicidad y potencial exposición para el hombre. La lista de la CERCLA se revisa y publica periódicamente (cada dos años). Hay que destacar que esa lista no se corresponde con las sustancias más tóxicas, pero la priorización de sustancias se basa en una combinación de su frecuencia, toxicidad y exposición potencial para el hombre, estando incluidos el BaP (nº 8), BbF (nº 9), PAHs (nº 10), BaA (nº 38), BkF (nº 59), Fl (nº 96), Cri (nº 116), IndP (nº 177), Pir (nº 236) y Ant nº (265) (ATSDR, 1997a).

Además, la ATSDR (1997b) ha desarrollado unos niveles de mínimo riesgo (MRLs), estimando la exposición humana diaria a sustancias peligrosas que no conllevan riesgo de producir cáncer durante un tiempo específico de exposición. Para fijar dichos niveles deben existir datos suficientes de identificación del órgano afectado, duración específica en los mismos y ruta de exposición a las sustancias. Para el Ant y Fl por vía oral, durante una exposición intermedia (de 14 días a un año), los valores de MLRs son 10 y 0.4 mg/kg/día, respectivamente, siendo la ruta afectada la hepática.

La ATSDR (1990), también recoge un estudio realizado en animales de laboratorio después de la ingestión de BaP, durante períodos de tiempo cortos (inferior a 14 días) y largos (superior a 14 días), observando que la ingestión de 120 mg/kg/día les produce la muerte en ambos casos. La ingestión de 10 mg/kg/día durante períodos cortos produce efectos adversos en la reproducción de animales (malformaciones). En humanos, las exposiciones durante tiempos largos a dosis de 0.01 mg/kg/día presentan el riesgo de producir efectos nocivos, aunque no cáncer.

La principal fuente de entrada de los PAHs en el cuerpo humano, es el pulmón, al respirar el aire o humo que contiene. Además, también penetra a través del sistema digestivo, cuando las sustancias que contienen dichos compuestos son ingeridas. Y por último, a través de la piel, si se entra en contacto con suelos o con aceites que contienen altos niveles de PAHs (ATSDR, 1990).

En cuanto a las concentraciones máximas permisibles (CMP) de 10 PAHs (Naftaleno, Ant, Fenantreno, Fl, BaA, Cri, BkF, BaP, BghiP e IndP) (Kalf y col. 1997), las fijan en diferentes concentraciones, según la matriz, siendo para:

- agua: 1.2, 0.07, 0.30, 0.30, 0.01, 0.34, 0.04, 0.05, 0.03 y 0.04 µg/L
- suelos: 0.14, 0.12, 0.51, 2.6, 0.25, 10.7, 2.4, 0.26, 7.4 y 5.9 mg/kg
- sedimentos: 0.14, 0.12, 0.51, 2.6, 0.36, 10.7, 2.4, 2.7, 7.5 y 5.9 mg/kg

Aunque otros autores (Bories, 1990) consideran que la fijación de límites de polución no es teóricamente factible, en tanto no pueda fijarse un umbral de toxicidad para estas sustancias. No obstante, a la hora de fijar niveles máximos, no deben anteponerse los conceptos analíticos a los sanitarios, fijando límites excesivamente bajos influenciados por los métodos analíticos modernos, que permiten disminuir progresivamente los límites de detección.

2. PRESENCIA DE PAHs EN LAS AVES RAPACES

El interés de las aves rapaces estudiadas radica en que actualmente son especies protegidas y catalogadas de interés especial, siendo escasos los datos disponibles sobre su estado sanitario y sus enfermedades parasitarias.

Las aves rapaces son especies eminentemente depredadoras y carroñeras, lo que les confiere un importante papel en el ecosistema al situarse en las escalas más altas de la pirámide trófica, y actuar como reguladoras controlando la densidad y distribución de las especies sobre las que predan, pudiendo ser utilizadas como bioindicadores de polucionantes presentes en el ecosistema; como los PAHs presentan un alto carácter

lipofílico, se pueden acumular fundamentalmente en el tejido adiposo de estos organismos vivos.

Cada especie animal posee un nombre único, basado en el latín y/o griego. El sistema que se utiliza es el formulado por el botánico sueco Carolus Linnaeus (1707-1778). De las dos palabras del nombre, la primera se denomina nombre genérico al que pertenece la especie; y la segunda es el nombre específico, ya que indica la especie en particular. Se ha llegado al acuerdo de escribir el nombre genérico empezando con una letra mayúscula, el nombre específico en minúscula, y ambos en cursiva (Perrins, 1987).

Las tres especies de aves rapaces suministradas a través del Departamento de Parasitología, del Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios de la Universidad de Santiago de Compostela procedentes de cuatro Centros de Fauna Salvaje de Galicia localizados en Oleiros (La Coruña), El Veral (Lugo), Rodicio (Orense) y Cotorredondo (Pontevedra), corresponden a una especie diurna (*Buteo buteo*), y dos especies nocturnas (*Strix aluco* y *Tyto alba*).

La clasificación de las aves rapaces analizadas es la siguiente (Inter Natura, Perrins, 1987):

ORDEN ACCIPITRIFORMES

Familia Accipitridae

Ratonero (*Buteo buteo* L.)

ORDEN STRIGIFORMES

Familia Strigidae (Búhos)

Cárabo (*Strix aluco* L.)

Familia Tytonidae (Lechuzas)

Lechuza común (*Tyto alba* S.)

A continuación se citan las principales características de cada especie analizada:

- El tamaño medio del pájaro adulto se expresa en centímetros, desde la punta del pico hasta el extremo de la cola, cuando el ave está extendida. Aunque esto último

sólo ocurre en los ejemplares muertos, resulta un buen criterio de medida (Perrins, 1987).

- El peso de las aves varía considerablemente según las condiciones de alimentación, la estación, la raza geográfica y otros muchos factores; en particular las aves acumulan grandes cantidades de grasa antes de la migración, y algunos pájaros pequeños pueden doblar su peso antes de iniciar un vuelo largo (Perrins, 1987).

- El número habitual de nidadas anuales y de días que dura la incubación.

- El número de días que transcurren habitualmente desde que el polluelo sale del huevo hasta que echa las plumas. Cuando el pájaro joven ha alcanzado la fase en que puede volar, pasa por un período de inmadurez (Inm) durante el cual conserva su plumaje juvenil hasta mudar al plumaje adulto (Adulto) (Perrins, 1987).

- Respecto a la edad se indican tres datos. La primera cifra es la edad (en años) en que la especie suele empezar a criar. La segunda cifra indica la edad más avanzada que alcanza la especie en estado silvestre. Y la tercera cifra muestra el porcentaje de pájaros adultos que sobreviven de un año al siguiente (Perrins, 1987).

- Hábitat y distribución, comportamiento, alimentación, reproducción, factores limitantes y medidas de conservación.

2.1 *Buteo buteo* (Ratonero común) (Perrins, 1987, Del Hoyo y col., 1994; Díaz y col. , 1996; Inter Natura).



Fig. 24. Fotografía del ratonero.

Descripción:

Es un ave rapaz diurna de tamaño mediano (longitud: 50-57 cm, envergadura: 113-128 cm, peso: **Macho:** 525-1183 g y **Hembra:** 625-1364 g), con plumaje relativamente variable; alas relativamente largas y anchas, cola ancha y corta de forma redondeada con varias finas franjas transversales y con una franja terminal más ancha. Cabeza robusta y cuello corto. Al remontarse presenta las alas elevadas y echadas hacia adelante. Edad 3, 25, 81%.

Los **Adultos** presentan una parte superior marrón oscuro, con líneas blancas en la cabeza. Parte inferior de gran variedad de colorido desde muy oscuros a muy claros presentando unas manchas claras llamativas debajo de las alas. El pecho es blanquecino con multitud de manchas oscuras. En la cola presenta unas bandas transversales oscuras, finas y una línea subterminal más ancha. Los dos sexos son iguales respecto al colorido. Los **Jóvenes** son muy parecidos a los adultos, pero con la cabeza, dorso y partes inferiores más claras. En la cola falta la banda subterminal ancha.

Hábitat:

Predominan en las zonas boscosas frente a las de matorral, que normalmente son utilizadas junto a las zonas cultivadas como cazaderos. Se observan también en las zonas boscosas mixtas. En invierno utilizan los terrenos abiertos con árboles dispersos. Es decir, se encuentran en hábitats abiertos: montañas, costas, regiones agrícolas con bosques.

Comportamiento:

Es una especie sedentaria en España, que se distribuye por toda la Península, detectándose las mayores densidades invernales en la Meseta Norte, Extremadura y Galicia, más cuanto más cerca de áreas montañosas.

Alimentación:

La alimentación es muy variada, adaptándose a diferentes tipos de presa, según la localidad donde se encuentre, y según la estación del año. Está basada principalmente

en reptiles, mamíferos pequeños y medianos (ratas, hámsters...), especialmente conejos, pequeñas aves y carroña.

Reproducción:

Suelen nidificar en pinos, donde construyen varios nidos de tamaño medio junto a la horquilla principal. Para la construcción utilizan troncos y ramas de pino y matorral leñoso tapizando esta estructura con ramitas y hojas de pino. La puesta suelen efectuarla a mediados de marzo-abril. En ocasiones muy aisladas pueden nidificar en repisas de cortados rocosos.

Suelen ser de 1 a 5 huevos blancos, moteados de pardo rojizo, 57 mm. Los huevos eclosionan a los 30-35 días.

Factores limitantes y medidas de conservación:

Es una de las rapaces que más ha disminuido en los últimos años debido fundamentalmente a la gran deforestación (incendios forestales) y a la persecución directa por parte del hombre, sobre todo por la caza ilegal.

2.2 *Strix aluco* (Cárabo común) (Perrins, 1987; Díaz y col. , 1996; Brinzal, 1998; Inter Natura)



Fig. 25. Fotografía del cárabo.

Descripción:

Es un ave rapaz nocturna de mediano tamaño (longitud: 37-46 cm, envergadura: 90-100 cm, peso: **Macho:**330-490 g y **Hembra:** 336-695 g). Tienen forma rechoncha, no posee penachos y el rostro está dividido por una franja. El plumaje es muy críptico, y existen dos coloraciones: gris y pardo-rojiza, con estados intermedios. Posee alas cortas y anchas, y cola corta también para maniobrar bien entre ramas y follaje. Tienen el pico amarillo y los ojos negros, con el borde del párpado rosado. Existe un fuerte dimorfismo sexual en cuanto al peso: las hembras son mucho mayores que los machos. Edad 1, 18, 74%.

Los **Adultos** presentan el dorso, alas y cabeza de color castaño rojizos o grises gaspeados de negro. Sobre las plumas escapulares y las coberturas de las alas destacan unas manchas blanquecinas. El pecho y vientre va de colores rojizos a grisáceos con manchas verticales oscuras. El disco facial bien delimitado, dividido por una raya gruesa y negra que parte de la frente y llega a la base del pico. Presenta gran variabilidad de colorido individual, aunque predominan los rojizos y grises en España, aunque existe otro marrón en Europa,

Hábitat y Distribución:

Permanecen en el territorio en el que nidifican durante todo el año, siendo su hábitat más típico el bosque caducifolio, de coníferas, dehesas, aunque pueden vivir próximos al hombre, y utiliza cortados rocosos de barrancos.

Distribución discontinua en la Península por la fragmentación de bosques. Sólo accidental en las Islas.

Comportamiento:

Es una especie sedentaria en España, aunque los más jóvenes pueden dispersarse hasta distancias moderadas (39 Km).

Es uno de los búhos más nocturnos. Normalmente son monógamos y mantienen la misma pareja año tras año, aunque se ha dado casos de machos polígamos.

El método de caza es la espera desde un posadero, aunque también lo hacen en vuelo. Caza siempre de noche. Tiene dos picos de actividad: inmediatamente después de la puesta de sol y un poco antes de amanecer.

El territorio de caza del cárabo es de aproximadamente de 1 Km².

Alimentación:

Tienen una dieta muy variada, consumiendo pequeños mamíferos (32.1% de las presas), insectos, invertebrados (64.3%) y, minoritariamente aves, anfibios y reptiles, dependiendo de las estaciones del año. Es muy generaliza en su alimentación, explotando una u otra presa según su abundancia. Este factor, unido a la adaptabilidad de la especie, determina la tendencia a la alta de su población.

Reproducción:

No construye nido alguno, simplemente utilizan como nido agujeros naturales de árboles o agujeros en las rocas de los cortados e incluso utiliza agujeros de edificaciones humanas como iglesias, aunque aceptan muy bien las cajas de nido. No aportan ningún tipo de material al nido. La época de cría comienza a mediados de marzo. Ponen de 2 a 4 huevos de 47 mm, con intervalos de 48 horas, casi redondos y completamente blancos. Son incubados durante 28-30 días, y desde el primer huevo, por la hembra, mientras que el macho aporta la comida. Los pollos dejarán el nido a los 30 días, siendo posible observarlos por las ramas de los árboles, pero dependen de los padres para comer hasta 3 meses después. La actual política forestal ha propiciado que los cárabos se vean obligados a utilizar los sitios tradicionales de cría de la lechuza.

Factores limitantes y medidas de conservación:

Las mayores densidades están situadas por encima de la línea de los 800 m, y la causa más importante de su distribución es el expolio, a veces bienintencionado, de los jóvenes no volanderos. A causa de su estatus poblacional y de la competencia que ejerce con la lechuza, no se estiman necesarias medidas especiales para su conservación.

2.3 *Tyto alba* (Lechuza) (Perrins, 1987; Díaz y col. , 1996; Brinzal, 1998; Inter Natura)



Fig. 26. Fotografía de la lechuza.

Descripción:

Es un ave rapaz nocturna de tamaño mediano (longitud: 33-39 cm, envergadura: 90-95 cm, peso: **Macho:** 290-340 g y **Hembra:** 330-360 g), fácilmente reconocible por su blanca coloración general y por su característico disco facial en forma de corazón. A diferencia de otras especies no posee penachos. Sus ojos son de color negro y el pico color marfil. Edad 1(2), 18.

Se diferencian dos subespecies:

T. a. alba: Predominante en el sur de Europa, posee el pecho de color blanco más o menos moteado y el dorso es color ante.

T. a. guttata: Más característica del centro y norte de Europa, se diferencia de la anterior en que el pecho es color ante, muy moteado, y las partes dorsales de color pardo rojizo dorado.

Existen coloraciones intermedias resultado de la hibridación de ejemplares de ambas subespecies (Brinzal, 1998).

Los **Adultos** presentan el dorso y partes superiores de las alas de colores rojizos, con tonalidades doradas de tonos grises. La cabeza es amarilla dorada con tonos grises en la parte más alta. El disco facial forma un corazón enmarcado de plumas cortas y tonos dorados. En las partes inferiores destaca el blanco puro del pecho y vientre, en las alas este color está salpicado por unos puntos negros. Las patas sobresalen enormemente. Los **jóvenes** son muy similares a los adultos (Internatura).

Hábitat y Distribución:

Es una especie de espacios abiertos. Descansa y cría en casas viejas, graneros, buhardillas, etc., es decir, muy ligada a zonas pobladas, aunque también habita grietas y cuevas en escarpes rocosos por debajo de los 1300m de altitud.

La lechuza común puede encontrarse en toda la Península Ibérica (Brinzal, 1998).

Comportamiento:

Es una especie sedentaria en España, con un territorio fijo durante todo el año, con dispersiones juveniles de corta distancia (87 Km). El tamaño de su territorio varía en función de la existencia de sitios para alojarse y de la disponibilidad de alimento. Generalmente habitan en zonas agrícolas abiertas.

La mayoría de los adultos permanecen emparejados en invierno.

Tienen dos fases de actividad: la primera poco después de la puesta de sol, y la otra antes del amanecer. Sin embargo, durante la época de cría o en invierno, puede cazar durante todo el día. La caza la realizan desde algún posadero o percha, o bien mediante cernidos e inspecciones por el terreno con vuelo bajo. La mayoría de las presas las consigue en el suelo, a veces sobre arbustos.

Su vuelo es completamente silencioso, lo que le permite escuchar los ruidos que delatan a las presas y acercarse a ellas sin ser escuchada.

Alimentación:

La dieta es muy diversa, basada principalmente en micromamíferos, sobre todo pequeños murinos (ratón de campo y ratón doméstico), microtininos (ratillas y topillos) e insectívoros (musarañas), aunque también de forma ocasional pueden alimentarse de otros mamíferos de tamaño medio, aves, ranas, lagartos e insectos. En Galicia concretamente su principal alimentación consiste en microtininos, murinos e insectívoros. Ingiere diariamente unos 100 g de comida, y tragan las presas enteras, o si se trata de pollos, decapitadas.

Reproducción:

Anidan en campanarios, graneros, desvanes o cualquier hueco de edificios, pero no construyen nido sino que la puesta se realiza sobre una capa de egagrópilas. La primera puesta suele ser hacia el mes de abril, a veces se da una segunda en el mes de julio, e incluso existen citas de una tercera puesta.

Suelen ser de 4 a 7 huevos blancos elípticos de 40 mm. Los huevos eclosionan a los 30-34 días, y los pollos estarán recubiertos de un primer plumón los primeros 15 días, siendo sustituido por otro más largo. A esta edad ya tragan las presas enteras y hacia la novena semana vuelan perfectamente.

Factores limitantes y medidas de conservación:

El principal factor limitante es la línea de los 800 m, lo que limita el gradiente poblacional.

Sin embargo, fuera de este factor natural, la pérdida de lugares de nidificación supone el principal problema para la especie. Además cabe destacar la altísima tasa de mortalidad que se produce en carreteras (atropello), caza ilegal, expolio de nidos, así como la influencia que tienen los raticidas y rodenticidas debido a sus hábitos alimenticios.

2.4. LEGISLACIÓN

La Orden del 9 de Julio de 1998 (BOE 172/1998 del 20 de Julio de 1998), corregida el 11 de Agosto de 1998 (BOE 191/1998), por la que se incluyen determinadas especies en el Catálogo Nacional de Especies amenazadas y cambian de categorías otras especies que ya están incluidas en el mismo, catalogan la propuesta de la Comisión Nacional de Protección de la Naturaleza, y en virtud de lo establecido en el Anexo II del Real Decreto 439/1990 (BOE 82/1990 del 30 de Marzo de 1990), a las especies de aves objeto de este estudio, como Especies de Interés Especial.

3. EXTRACCIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La extracción de fluidos supercríticos (SFE) es una buena alternativa a los métodos convencionales de extracción con solventes líquidos (soxhlet, sonicación...), donde la extracción "líquida" se realiza con un fluido supercrítico. Este fluido supercrítico, es una sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico. Los valores de presión y temperatura en el punto crítico se denominan respectivamente presión y temperatura críticas, y dependen de la naturaleza del fluido (Langefeld y col., 1994; Tena y col., 1994; Gadzala y Buszewski, 1995).

En el diagrama de fases (presión frente a temperaturas), el punto crítico es aquel en que se interrumpe la curva de equilibrio líquido-gas o curva de vaporización (Fig. 27).

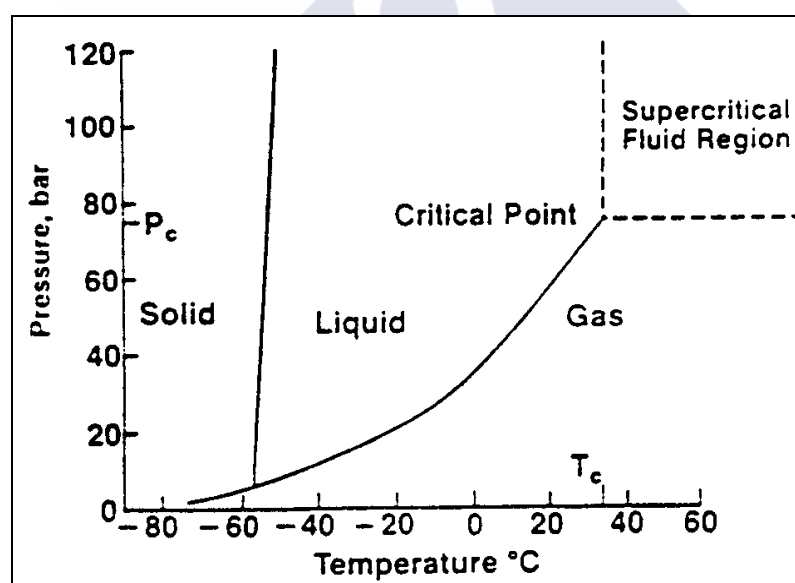


Fig. 27. Diagrama de fases del CO₂.

El área situada encima del punto crítico y hacia la derecha, es la región supercrítica. En esta región, un fluido no es ni un líquido ni un gas, tiene propiedades de ambos. Lo cual es indicativo de que no importa cuanta presión es aplicada, ya que un

fluido en esta región no se condensa. Y además, no importa que la temperatura sea incrementada, porque el fluido en esta región no es vaporizado.

Por tanto, un fluido supercrítico posee propiedades físicas de un gas (viscosidad y difusividad), y propiedades químicas de un líquido (poder de solvatación y densidad). Lo cual le confiere una serie de ventajas (Hewlett Packard, 1990; Gadzala y Buszewski, 1995):

- Poder solvente: muchas sustancias son solubles en el fluido.
- Elevada difusividad: las sustancias químicas disueltas se propagan rápidamente a través del fluido a velocidades comprendidas entre aquellas de los gases y líquidos verdaderos.
- No presentan tensión superficial: el fluido penetra en pequeñas hendiduras del material.
- Baja viscosidad: facilita la entrada del fluido en las matrices a extraer.

Esta combinación de propiedades permite a los fluidos supercríticos penetrar en un material como un gas, pero con la diferencia importante de que poseen propiedades solventes, similares a las de los líquidos. Por todo ello, son unos candidatos muy interesantes para la extracción de muestras.

3.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción con fluidos supercríticos puede llevarse a cabo con dos tipos de métodos: "offline" y "online" (Hewlett Packard, 1990; Camel y col., 1992b).

3.1.1. MÉTODO "OFFLINE"

Se caracterizan porque los procesos de extracción y análisis se realizan individualmente. Las principales variaciones para la realización de la extracción son las siguientes:

- **Estática:** la muestra se empapa en el fluido supercrítico. Después de algún tiempo, el fluido se bombea hacia la columna de retención, donde los analitos son concentrados. Este período es útil cuando los analitos no se separan fácilmente de la matriz, lo cual puede ser causado por una baja disolución o una matriz muy densa.

- **Dinámica:** el fluido supercrítico se bombea hacia la muestra, pasando a través de ella una sola vez. Posteriormente se dirige hacia la columna de retención.

Es un proceso efectivo, donde el analito es bastante soluble, y la matriz es fácilmente penetrable.

- **Recirculación:** el fluido se bombea repetidamente a través de la muestra. Después de algún tiempo el fluido se conduce hacia la columna de retención, donde se produce su evaporación y la concentración del analito.

Los sistemas analíticos de SFE, usualmente combinan la extracción estática y dinámica. Al principio de la extracción, la celda conteniendo la muestra se llena del fluido supercrítico, llevando a cabo durante unos minutos un tiempo de equilibrio. Luego, el fluido pasa a través de la celda, de modo que el fluido supercrítico frío pasa a través de la muestra.

3.1.2. METODO "ONLINE"

Se caracteriza por la realización de procesos de extracción y análisis de forma combinada. La columna de retención se reemplaza por una conexión directa al instrumento analizador. Éste puede ser un cromatógrafo de fluidos supercríticos, o con una conexión más compleja que separe fluidos y analitos, además de algunos aparatos.

Este método presenta mayor sensibilidad, puesto que el extracto es conducido directamente al instrumento analizador, reduciendo la posibilidad de error por eliminación de pasos intermedios.

3.2. APLICACIÓN A PROCESOS DE EXTRACCIÓN

Algunos parámetros afectan a la eficacia y reproducibilidad de la extracción mediante SFE.

La extracción con aplicación de fluidos supercríticos presenta dos importantes diferencias con respecto a la extracción con un solvente ordinario:

- La extracción se lleva a cabo en el punto crítico del fluido.
- El poder solvente del fluido depende de la presión.

Los procesos de extracción convencionales utilizan una gran variedad de solventes para la extracción de diferentes analitos. Ningún solvente solo es adecuado para todas las posibles muestras.

3.2.1. PODER SOLVENTE, DENSIDAD Y PRESIÓN

El poder solvente de un fluido supercrítico puede ser controlado por variación de su presión y temperatura. Esto permite llevar a cabo extracciones selectivas con un único fluido, variando las condiciones de extracción. Incluso se puede realizar un fraccionamiento extrayendo la misma muestra a dos o más densidades diferentes. Si se mantiene constante la temperatura del fluido, se incrementa la densidad con la presión. Y al aumentar la presión, se incrementa la solubilidad, pudiendo extraer una gran variedad de componentes dependiendo de la presión aplicada al sistema (Hewlett Packard, 1990; Camel y col., 1992b).

Por tanto, la variación del poder solvente con la densidad es un factor importante en la extracción de fluidos supercríticos, y una de las mayores razones para su utilización, siendo la otra razón su propiedad de difusividad.

En el caso de los fluidos supercríticos, la densidad es proporcional a la presión de operación a temperatura constante (Fig. 28).

El punto crítico es la triple intersección en el centro del diagrama, donde las tres variables son reducidas a una. Un pequeño incremento en la presión produce un gran incremento en la densidad del fluido. Por tanto, el área de operación más eficaz es justo por encima del punto crítico. Por ejemplo, justo por encima de la temperatura crítica del CO_2 (31.1°C), un cambio de presión de 73 bar a 350 bar, varía la presión de 0.4 a 0.9 g/mL; pero si elevamos la presión a 700 bar, la densidad sólo varía de 0.90 a 0.98 g/mL, debido a que las curvas se allanan rápidamente al alejarse del punto crítico.

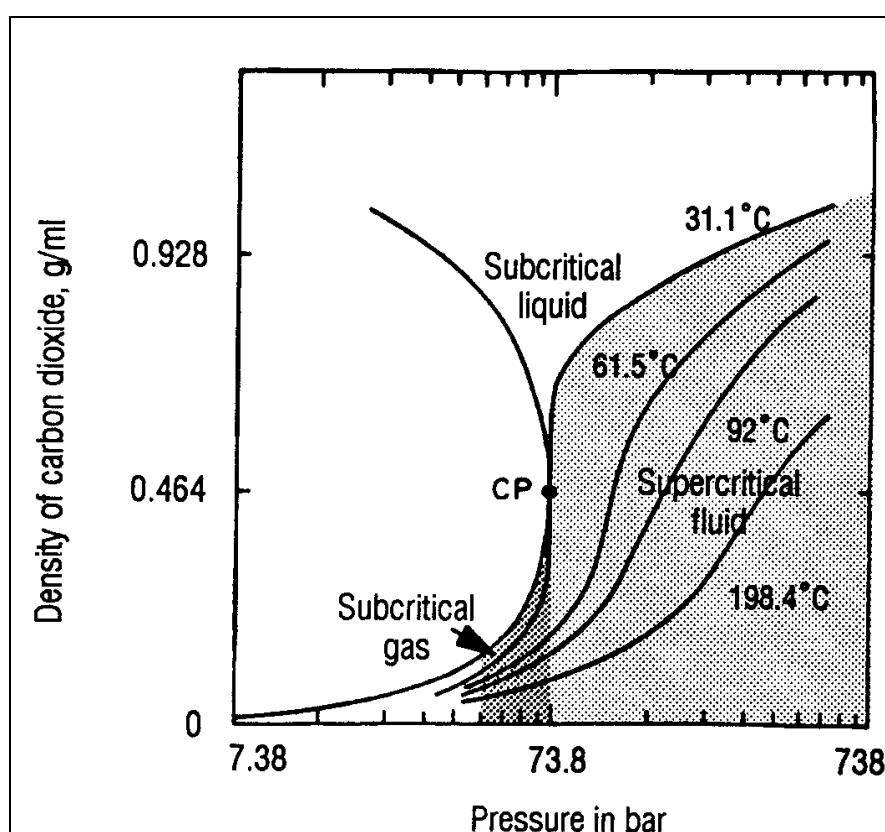


Fig. 28. Diagrama de fases que muestra las regiones supercríticas y subcríticas del CO_2 .

Hay otra parte del diagrama que es útil en el proceso de extracción, es el área sombreada en oscuro, situada justo a la izquierda de la región supercrítica. En esta zona subcrítica las curvas no tienen tanta pendiente como en la región supercrítica, pero todavía hay una dependencia bastante fuerte entre la densidad y la presión como para ser utilizada (Hewlett Packard, 1990).

La presión se puede expresar en diferentes unidades, recogiendo a continuación sus equivalencias:

$$1 \text{ MPa} = 10 \text{ bar} = 145 \text{ psi} = 9.86 \text{ atm} = 10^7 \text{ dinas/cm}^2 = 10 \text{ kg/cm}^2$$

3.2.2. FLUÍDOS Y FLUJO

Se pueden utilizar diferentes fluidos para la extracción en condiciones supercríticas, recogiendo en la Tabla 3, alguno de ellos (Hewlett Packard, 1990; Guinamant, 1992).

Tabla 3. Valores de temperatura y presión críticas de diferentes fluidos.

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Etileno	9.3	50.4
Dióxido de carbono	31.1	73.8
Etano	32.3	48.8
Óxido nitroso	36.5	72.7
Propileno	91.9	46.2
Propano	96.7	42.5
Amoníaco	132.5	112.8
Hexano	234.2	30.3
Agua	374.2	220.5

Las propiedades químicas y mecánicas de un sistema de fluido supercrítico dependen de la presión y temperatura. Requerimientos excesivamente elevados de ambas variables provocan que el aparato de extracción sea demasiado caro para ser práctico. Este es el caso del **agua**, cuyos valores críticos (temperatura y presión) se encuentra entre los más altos de los solvente comúnmente utilizados.

El **amoníaco** presenta la desventaja que es muy desagradable su manipulación. Son necesarias precauciones de ventilación (campana de gases) para mantenerlo fuera de la atmósfera del laboratorio.

El **óxido nitroso** ha sido extensamente utilizado. Es polar y presenta valores razonables de temperatura y presión críticas. Sin embargo, hay evidencias de

explosiones violentas al reaccionar el óxido nitroso y aceites y grasas. Por esta razón, debe ser usado con gran cuidado, y no es adecuado como fluido de extracción de forma general.

Los **hidrocarburos** son inflamables con riesgo de explosión.

El **dióxido de carbono** es el fluido más comúnmente utilizado debido a sus propiedades (Camel y col., 1992b; Langenfeld y col., 1994):

- Parámetros críticos compatibles con varios solventes: temperatura crítica de 31.1 °C (88°F), sólo ligeramente superior a la temperatura ambiental del laboratorio. Lo cual es deseable para mantener estables ciertos analitos que se alteran por el calentamiento. Y presión crítica de 73.8 bar (1070 psi), la cual no es difícil de alcanzar.

- No es inflamable, es inodoro y químicamente inerte.
- Está disponible con elevada pureza y a bajo coste, lo cual no dificulta la extracción.
- Baja toxicidad.

Por todo esto, el CO₂ es el candidato ideal para su uso en la extracción con fluidos supercríticos.

Una vez seleccionado el fluido a utilizar hay que establecer el flujo del mismo. Cuanto más bajo es, más impregna la muestra, y más tiempo está en contacto con la matriz, permitiendo la penetración del fluido en la matriz, y estableciendo un equilibrio mejor entre el soluto y el fluido supercrítico. Pero flujos demasiado bajos requieren largos tiempos de extracción. Por otro lado, la rapidez del flujo puede incrementar pérdidas del analito durante la despresurización del fluido supercrítico. Por ello, este parámetro debe de ser optimizado (Camel y col., 1992b).

3.3. SOLVENTES MODIFICADORES

Hay que tener en cuenta la naturaleza de la muestra. Si el soluto es polar, el CO₂ puede ser incapaz de extraerlo cuantitativamente, siendo necesario añadir un pequeño porcentaje de un solvente polar, directamente a la muestra o como fluido supercrítico

con una segunda bomba, incrementando así su solubilidad (Camel y col., 1992b; Gadzala y Buszewski, 1995). Una mezcla en pequeño porcentaje de acetona, metanol o cloruro de metileno en el CO₂, puede no alcanzar las propiedades supercríticas, sino que probablemente se sitúa en la región subcrítica, pero presenta la ventaja de que combina el poder solvente del CO₂ de elevada densidad, con la naturaleza polar del modificador añadido (Hewlett Packard, 1990).

Dependiendo del tipo de matriz de la muestra y de cómo retiene el analito deseado, el modificador ejerce su influencia de tres maneras diferentes (Tena y col., 1994):

1- Incrementando la solubilidad del analito en el fluido supercrítico, como resultado de las interacciones analito-modificador en la fase fluida.

2- Facilitando la desorción del analito: los modificadores polares son capaces de interactuar con la matriz y competir eficazmente con los analitos activos de la matriz.

3- Distorsionando la matriz: la difusión del analito y penetración del fluido supercrítico en la matriz, están favorecidas cuando ésta es dilatada por el modificador. Este fenómeno parece ser un factor importante en la extracción con fluidos supercríticos mejorada por un modificador. El efecto opuesto se observa si el modificador produce la contracción de la matriz.

Los cosolventes modificadores pueden ser incluidos en el proceso de extracción mezclados con el extractante o bien con las muestras. Cada uno de estos procedimientos presenta sus ventajas. Para la elección del modo de adición, hay que tener en cuenta el mecanismo modificador, la instrumentación disponible y el coste del fluido.

3.4. ADSORBENTES EN FASE SÓLIDA Y SOBRECARGAS

De fundamental importancia es la naturaleza de la matriz. Matrices como cremas, emulsiones, líquidos y sólidos, requieren pretratamientos como la liofilización, adición de agentes desecantes o adsorbentes, o inmovilización de la muestra en un

soporte inerte como el papel de filtro, ya que se aumenta el área de superficie expuesta al fluido supercrítico (Camel y col., 1992b).

Los adsorbentes en fase sólida se utilizan en técnicas combinadas de SFE-SFC, donde el adsorbente actúa como columna cromatográfica, permitiendo la elución selectiva de los analitos.

Alternativamente, se han utilizado los adsorbentes en fase sólida como eficaces rellenos de columnas de retención para la extracción con fluidos supercríticos por métodos "offline" (sílica gel, alúmina, florisil...), así como para mezclar directamente con la muestra, ejerciendo una primera purificación de la misma, y permitiendo la retención de la matriz en el vaso de extracción.

La elución de analitos desde adsorbentes en fase sólida está controlada por una serie de factores interrelacionados (Furton y Lin, 1993). Entre estos cabe citar la afinidad de los analitos por el adsorbente, la presión de vapor de los analitos, la solubilidad y el coeficiente de difusividad de los mismos en el fluido supercrítico.

Otra consideración es la forma en que los analitos se incorporan a la matriz (sobrecarga). Todos los solutos no pueden ser extraídos, especialmente si la matriz es muy adsorbente (partículas de aire). Por ello, las muestras sobrecargadas no siempre representan la verdadera extractibilidad de los materiales contaminados, pudiendo sobrestimar la eficacia de los métodos de extracción (Camel y col., 1992b; Tena y col., 1994). Dicha eficacia depende en gran medida de la naturaleza de la matriz y del procedimiento de sobrecarga.

Además, las técnicas de sobrecarga, habitualmente requieren un solvente orgánico como vehículo para depositar el analito en la matriz, y este solvente puede afectar a la integridad química de la muestra y producir diferentes condiciones de deposición en comparación con los analitos ya presentes en ella. La competición entre moléculas de solvente y analito por los lugares de adsorción presentes en la matriz cuando el analito es depositado desde una solución líquida, puede impedir

recuperaciones elevadas. Se ha propuesto la deposición del analito desde una fase vapor para eliminar esta competición.

La dificultad de los analitos sobrecargados de representar exactamente el comportamiento en la extracción de los analitos presentes en las muestras no es exclusiva de la extracción con fluidos supercríticos, sino que es un problema generalizado en los métodos de extracción sólido-líquido.

Por tanto, las recuperaciones dependen de las condiciones experimentales (presión, temperatura, fluido, flujo, tiempo y modo de extracción), de la naturaleza del compuesto a extraer (P_m , volatilidad, estructura química y polaridad), y de la matriz (tamaño de partícula, porosidad, área específica, polaridad y humedad) (Camel y col., 1992a).

3.5 VENTAJAS

La aplicación de los fluidos supercríticos a procesos extractivos reporta numerosas ventajas frente a los métodos utilizados convencionalmente en el laboratorio, entre las cuales destacan (Camel y col., 1992a; Barnabas y col., 1995):

- Menor volumen de solvente necesario, lo cual reporta una ventaja tanto económica como medioambiental.
- Tiempos más cortos de extracción.
- No degrada los analitos.
- Flexibilidad.
- Selectividad, siendo en muchos casos innecesarias etapas posteriores de purificación.
- Mayor automatización.

3.6 EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS HP7680A

El extractor de fluidos supercríticos de Hewlett Packard HP7680A (Fig. 29), utiliza el método de extracción "offline", combinando extracción estática y dinámica, las cuales son controladas por el usuario.

Para ello sigue las siguientes etapas de extracción:

1- El fluido extractante llena el thimble con la muestra. La bomba y el sistema de control de temperatura, lleva el fluido a la densidad y temperatura especificadas. No hay flujo a través de la muestra en ese tiempo.

2- La muestra se empapa del fluido extractante (extracción estática) durante un tiempo fijado por el usuario.

3- El fluido extractante se bombea hacia la muestra que posteriormente se dirige hacia la columna (extracción dinámica).

4- El solvente, elegido por el usuario, lava la columna de retención seleccionada donde se disuelven y transfieren los analitos deseados a un número de viales seleccionado.

5- Se recoge un volumen (mL) conocido que posteriormente se analiza a través de una técnica de análisis cuantitativa.

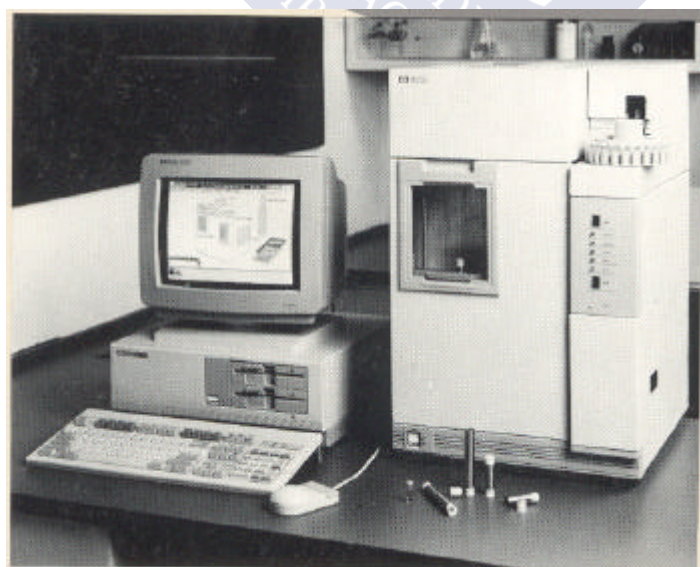


Fig. 29. Extractor de fluidos supercríticos HP7680A.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La determinación de PAHs continua siendo un reto para los analistas, ya que se presentan en niveles muy bajos y en matrices complejas, siendo necesario disponer de técnicas analíticas sensibles y rápidas que puedan ser utilizadas para el control efectivo de estos compuestos.

Con el fin de facilitar las tareas investigadoras relacionadas con la determinación de contaminantes orgánicos, entre ellos los PAHs, el NIST, ha preparado una serie de materiales de referencia estándar. Estos SRMs de PAHs representan tres niveles de dificultad analítica: 1) soluciones simples de calibración que contienen un nº de analitos (SRM 1491, 1647b, 2260) 2) mezclas naturales complejas (SRM 1597), y 3) matrices de material natural (SRM 1941, 1974). Las soluciones de calibración se utilizan para validar los métodos cromatográficos (tiempo de retención, respuesta del detector, estudios de recuperación); mientras que las mezclas naturales y las matrices son similares a las muestras analizadas, y se utilizan para validar el proceso analítico completo, incluyendo extracción, purificación, separación cromatográfica y cuantificación. Entre los materiales de referencia estándar para la determinación de PAHs hay una solución de calibración en ACN que contiene los 16 PAHs de la EPA certificados (SRM 1647b), e incluyendo 23 PAHs certificados hay una en hexano/tolueno (SRM 1491) y una en tolueno (SRM 2260). Mezcla natural existe una de alquitrán con 12 PAHs certificados, y de matrices naturales existen dos: una de sedimentos marinos con 11 PAHs certificados (SRM 1941), y otra de tejido de mejillón con 9 PAHs certificados (SRM 1974). Para la certificación de los PAHs se han utilizado las técnicas de HPLC-FL, GC-FID y GC-MS (Wise y col., 1992).

Los métodos de análisis utilizados para la determinación de PAHs son muy variados. Los primeros métodos analíticos utilizados han sido la cromatografía de papel y cromatografía en capa fina. Posteriormente se ha utilizado la espectrometría de absorción UV/Vis y la espectrofluorimetría sincrónica, sin encontrar ninguna aplicación a material

biológico o alimentos. Con la introducción de la cromatografía de gases y líquida, se aumenta la selectividad y/o precisión en el análisis.

La gran capacidad de resolución que presenta la cromatografía de gases, ha hecho que durante mucho tiempo haya sido la técnica de elección para el estudio de mezclas de PAHs en matrices muy variadas (alimentos, material biológico, sedimentos, etc.), utilizando como sistemas de detección el FID y/o MS. Acoplada al MS tiene la ventaja de presentar una mayor sensibilidad, sensibilidad y poder de resolución (Perfetti y col., 1992)

En los años setenta surge la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo desde entonces la técnica más utilizada para la determinación de PAHs en diferentes matrices, debido a su alta capacidad de separación, rapidez, mayor selectividad y sensibilidad, con detector de UV y fluorescencia. Sin embargo, con detector de fluorescencia es más sensible, particularmente para los PAHs de alto Pm, fijando longitudes de onda de excitación y emisión específicas (Perfetti y col., 1992), siendo esta técnica propuesta en diferentes métodos oficiales para el análisis de PAHs:

- El método recogido en la sección 6440 de la APHA (1992), aprobado anteriormente en 1987 por el Standard Methods Committee y aceptado por la EPA como equivalente del método 610 de la EPA, indica dos técnicas de análisis para la resolución de 16 PAHs: cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Método 610d), y HPLC- FL y UV (Método 610).

- El procedimiento propuesto por el ASTM (1989) para la determinación de los mismos compuestos en aguas (superficiales y potables); prácticamente coincide con el Método 610.

- Para aguas potables, el método 550.1 de la EPA, basado también en HPLC-FL y UV (PERKIN ELMER, 1993).

En los últimos años, se puede observar un creciente interés por los llamados fluidos supercríticos como técnica de extracción. La extracción con fluidos supercríticos (SFE), es

de desarrollo relativamente reciente, y por ello son numerosos los estudios realizados en los últimos años con la finalidad de determinar múltiples variables para la optimización del proceso (temperatura, presión, utilización de modificadores y adsorbentes) y/o su aplicación a diferentes matrices en la que extraen los analitos de interés, siendo pocos los análisis de PAHs en muestras de material biológico, en comparación con los trabajos realizados con técnicas de extracción más tradicionales (soxhlet, extracción líquido-líquido, etc.).

Entre los artículos recogidos de mayor interés desde 1986, destacan:

HAWTHORNE and MILLER, 1986, extraen Fl, Pir, BaA y BaP de material de referencia estándar (NBS1650), utilizando dos métodos de SFE con presión de 300 atm: 1) CO₂ a 45°C durante 90 min., y 2) CO₂ modificado con 5% de metanol a 65°C durante 30 min. El extracto se analiza por GC-MS, obteniendo recuperaciones similares, entre un 92±5% y 123 ±1.2% por el primero y del 98±2% al 125±0.2% por el segundo. La aplicación del segundo método al análisis de PAHs en gas-oil detecta un porcentaje mayor del 90% en su composición.

Los mismos autores en 1987, analizan 5 PAHs (Fl, BaA, BaP, BghiP e IndP) en polvo urbano (SRM 1649) por SFE; y tres PAHs deuterizados (d₁₀-Fenantreno, d₁₀-Pir y d₁₂-Perileno) en partículas de aire y sedimentos de río mediante SFE, soxhlet y sonicación. Para el SFE estudian diferentes fluidos supercríticos: CO₂ y NO₂ puros y con 5% de metanol como modificador y etano. Cada muestra se extrae durante 30 min. a 300 atm, temperatura 45°C para los fluidos puros y 65°C para los fluidos modificados con metanol. Las mejores recuperaciones en las tres matrices estudiadas se obtienen cuando se utilizan CO₂ y NO₂ con 5% de metanol, y en los PAHs de menor Pm. Los porcentajes de recuperación obtenidos en los 5 PAHs son del 100% para el Fl y BaA, del 60% y el 80% para el BaP con CO₂+MeOH y NO₂+MeOH, e inferiores al 50% para el BghiP e IndP. Los análisis de los extractos se realizan por GC-MS.

HAWTHORNE y col., 1989, estudian diferentes polucionantes ambientales, entre ellos PAHs, en espuma de poliuretano utilizando SFE a 380 atm y 45°C durante 20 min. de extracción. Las recuperaciones obtenidas para una concentración de 50 µg de PAHs son: Naftaleno y Fenantreno del 100±2%, para el Pir 103±5%, Cri 100±7% y para el Perileno del 97±6%. La cuantificación del extracto se realiza por GC-MS.

ISCO APPLICATIONS BULLETIN, 1991, determina 14 PAHs en suelos utilizando como método de extracción los fluidos supercríticos (CO₂). Realiza tres etapas de extracción con presión de 350 atm, dos de las cuales se realizan a temperatura de 90°C durante 30 min., y la tercera se realiza a temperatura de 120°C durante 60 min. El extracto se recoge en hexano y se analiza por GC-MS. Los porcentajes totales de recuperación de las tres extracciones para el Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, BbF y BaP son respectivamente del 117, 104, 115, 103, 106, 118 y 74%. Todos excepto el BaP dan recuperaciones altas en la segunda fracción.

LANGENFELD y col., 1992, extraen 66 compuestos, entre ellos PAHs, a 400 atm de presión y 50°C durante 40 min. de extracción mediante SFE. Estudian cinco solventes para la separación de dichos compuestos: cloruro de metileno, cloroformo, acetona, metanol y hexano. Los PAHs objeto de estudio son: Ant, Fl, Pir, Cri, BbF, BkF, BaP y BghiP. El solvente que muestra recuperaciones más bajas es el metanol (55-60%), seguido del hexano (70-80%). Entre los otros tres (cloroformo, acetona y cloruro de metileno) apenas hay diferencias, consiguiendo recuperaciones próximas al 90%.

LOPEZ-AVILA y col., 1992, analizan hidrocarburos del petróleo en varias muestras de suelos mediante SFE. La extracción se realiza a 340 atm y 80°C durante 30 min. (dinámica), con columna SS y temperatura del restrictor 150°C, usando como fluido supercrítico CO₂. El extracto se recoge en tetracloroetano, que posteriormente es purificado con sílica gel y se analiza por IR.

PORTER y col., 1992, determinan PAHs en sedimentos marinos (SRM 1941) y tejidos de mejillón (SRM 1974). La muestra de SRM 1941 se mezcla con agua y se le añade tierra de diatomeas como agente desecante para favorecer la extracción. Como fluido supercrítico se utiliza CO₂ modificado al 10% con cloruro de metileno, a 500 atm y 125°C durante 40 min., con el restrictor a 200°C. Se recogen 15 mL de extracto en cloruro de metileno que se purifican a través de una columna 1:1 ácido sulfúrico sílica gel y 10% de sílica gel nitrato de plata, eluyendo con hexano, que posteriormente se concentra para ser analizado por GC-MS. El SRM 1974 se mezcla directamente con tierra de diatomeas, siguiendo el mismo proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas para el Ant, Fl, Pir, BbF, BaP, BghiP e IndP en el tejido de mejillón oscilan entre el 80±8.5% para el BbF y 111±16% para el BghiP, y en el sedimento marino entre el 104±3.2% para el Ant y Fl y 133±13% para el BbF; en este sedimento determinan además, dos PAHs más, el BaA y el BkF, obteniendo recuperaciones del 143±8.2% y 148±13% respectivamente.

BICKING y col., 1993, estudian condiciones de presión y temperatura óptimas para la extracción de PAHs de suelos con SFE. El suelo desecado con sulfato sódico anhidro, se coloca en la celda de extracción y se extrae durante 60 min. en el modo dinámico a 55°C, 290 atm, y densidad 0.846 g/mL, obteniéndose unas recuperaciones superiores al 92%.

BURFORD y col., 1993, analizan tres muestras medioambientales: suelo de vías de tren, polvo urbano (SRM 1649) y lodos, modificando el sistema de sobrecarga. Cada muestra se extrae: a) con un tiempo de equilibrio de 10 min. a 60°C, seguido de una extracción a 400 atm, 60°C durante 30 min. con CO₂ puro; b) modificado con 10% de metanol durante 30 min. en iguales condiciones que a), y se compara con extracción por sonicación durante 30 min. con cloruro de metileno. Los tres extractos son cuantificados por GC/FID, concluyendo que los alcanos se encuentran exclusivamente en el extracto de CO₂ puro, mientras que los PAHs se encuentran en los tres extractos. Las recuperaciones de PAHs en los tres procesos oscilan de un 73 a un 113 % de SRM 1649.

DANKERS y col., 1993, comparan dos métodos de extracción: SFE y extracción líquido-líquido de acuerdo al procedimiento estándar NEN 5731, en material de referencia SRM 1647B (16 PAHs de la EPA) y muestras de suelo. Para ello 100 g de suelo desecado químicamente por adición de sulfato sódico, es enfriado bajo nitrógeno líquido y homogeneizado a partículas de 1 mm. La muestra se introduce en el thimble, añadiendo DCM como modificador; y se extraen con densidad 0.76 g/mL, presión 350 atm y temperatura 90°C, durante 15-20 min., recogiendo un extracto de 15 mL en DCM, que se analiza por HPLC-UV con bomba de gradiente; columna termostatzada a 30°C, ACN:agua como fase móvil y flujo 1.5 mL/min. Las recuperaciones por SFE son pobres para los PAHs de Pm mayor que el Pir (30-70%), y para el resto oscilan entre un 88 y un 100%, con una desviación estándar de 2-15%.

HAWTHORNE y col., 1993, estudian factores que influyen en la extracción de PAHs de matrices ambientales, utilizando la técnica SFE. Comparan los métodos "on-line" y "off-line", encontrando que en el segundo se obtienen recuperaciones más pobres de analitos volátiles (hexano, benceno). Evalúan el solvente de elución del método, obteniendo recuperaciones menores en hexano y metanol (58-80%), mientras que para el cloruro de metileno aumentan hasta un 90-93%, para el Pir y el BghiP. Estudian el flujo de CO₂ frente al porcentaje de recuperación, seleccionando 1.5 mL/min., así como los tiempos de extracción estática y dinámica necesarios, 5 y 15 min., respectivamente, y la posibilidad de añadir modificador directamente en la muestra ya puesta en la celda de extracción (metanol, anilina y tolueno, en proporciones de 10 y 1% de volumen), a 400 atm y 80°C: Los datos muestran que los resultados varían para los distintos modificadores, según el PAH, encontrando que si el modificador actúa extrayendo los analitos desde la matriz, y no por incremento de su solubilidad en el fluido de extracción, la simple adición de modificador a la muestra directamente puede ser suficiente, eliminando tener un doble sistema de bomba o de fluidos mezclados.

HILLS and HILL, 1993, evalúan la adición de HMDS y TMCS como derivatizantes, para la extracción de PAHs (Fenantreno, Fl, Pir y Cri) de material de referencia SRM 1649 (polvo urbano) y en sedimentos HS-3, aplicando SFE con CO₂ puro y modificado al 10% con metanol. Las condiciones son 350 atm a 60°C durante 15 min. de extracción estática y dinámica, columna SS, y volumen de 5 mL de tolueno. El extracto se analiza por GC-FID y GC-MS. Las recuperaciones obtenidas para los cuatro PAHs estudiados en HS-3 son de 105 ±27.1%, 99±8.1%, 165±20% y 300±13.2% con HMDS y TMCS (2:1), siendo seis veces más eficiente que con CO₂ puro, y dos veces más que con CO₂ modificado al 10% con metanol. Las recuperaciones obtenidas en SRM 1649 con HMDS y TMCS son de 221±1.62%, 97±1.60%, 107±4.36% y 162±2.67%, frente a las obtenidas con CO₂ puro que son del 14±0.3%, 89±0.7%, 69±0.6% y 27±0.2%.

LEE y col, 1993, desarrollan un método de extracción por SFE para los 16 PAHs de la EPA en muestras de sedimentos (CRM EC-1 y HS-3). Mientras el CO₂ es el menos eficiente para los PAHs de mayor Pm frente al NO₂ y freon-22, su eficacia se remedia usando una mezcla de agua, metanol y DCM como modificadores supercríticos, utilizando temperaturas altas de extracción (120°C) durante aproximadamente 70 min. Excepto para el Naftaleno se obtienen valores comparables con los certificados. Realizan tres etapas de extracción: 1) CO₂ puro a 34 MPa durante 7 min. (2 min. estáticos y 5 min. dinámicos) a 120°C y flujo 4 mL/min., recogiendo el extracto en 1.5 mL de 1:3 isooctano:DCM, 2) misma presión y temperatura con CO₂ mezclado con 1% de metanol y 4% de DCM a flujo 2 mL/min. durante 31 min. (1min. estático y 30 min. dinámicos), recogiendo 1.5 mL de la misma mezcla; y 3) CO₂ puro durante 2.5 min. a flujo 4 mL/min., recogiendo 1.2 mL de la misma mezcla. La combinación de los tres extractos se analiza por GC-MS. Apenas hay diferencias entre el metanol y DCM, aunque ambos son más eficientes que el agua. La presencia de metanol, agua y DCM como modificadores incrementa las recuperaciones de todos los PAHs, aunque tienen menos efectos en los de bajo Pm (Fenantreno) y mayor efecto en el IndP; y una mezcla 1:1:1 de los tres modificadores, da los mejores resultados para todos los PAHs. Los datos muestran que la segunda y tercera extracción son claramente beneficiosas en los porcentajes de

recuperación para el BaP y el IndP. Las recuperaciones que obtienen en EC-1, oscilan entre un $85\pm 0.2\%$ para el Ant y $108\pm 1.1\%$ para el BbF. En HS-3 entre un $81\pm 0.6\%$ para el BghiP y $114\pm 0.5\%$ para el BkF.

GERE y col., 1993, estudian la aplicación del SFE para el análisis de muestras medioambientales contaminadas con productos del petróleo (PAHs y PCBs). Los PAHs en muestras de suelo, se extraen por dos métodos de SFE con tres etapas de extracción: uno, desarrollado para el análisis por HPLC (mezcla de fluidos 95/1/4 (v/v/v) CO₂, metanol, agua), y otro, para el análisis por GC (95/1/4 CO₂, metanol y cloruro de metileno). El método de SFE (columna ODS), para la extracción de PAHs que se analizan por HPLC: 1) presión 1749 psi, temperatura de la cámara 120°C, densidad 0.22 g/mL, fluido CO₂ con flujo 2.0 mL/min. durante 2 min. de extracción estática y 10 min. de extracción dinámica, temperatura de la columna 5°C, y del nozzle 55°C. El solvente de lavado es 1:1 ACN:THF, recogiendo 0.8 mL a temperatura de la columna 60°C, y 45°C del nozzle, y flujo 1.0 mL/min. 2) presión 4899 psi, temperatura de la cámara 120°C, densidad 0.63 g/mL, mezcla de fluidos durante 1 min. de extracción estática y 30 min. de extracción dinámica, flujo 4.0 mL/min., temperatura de la columna 80°C, y del nozzle 45°C. En esta etapa no se recoge ningún extracto. 3) presión de 4899 psi, temperatura de la cámara de 120°C, densidad 0.63 g/mL, fluido CO₂ a 4.0 mL/min., 5 min. extracción estática y 10 min. de extracción dinámica, temperatura de la columna 60°C, y del nozzle 45°C. El solvente de lavado es 1:1 ACN:THF, recogiendo 0.8 mL a temperatura de la columna 80°C, y 45°C del nozzle, flujo 1.0 mL/min. El método de extracción para el análisis por GC, es el mismo variando la composición del fluido en las tres etapas de extracción; y las condiciones de lavado (50:50 metanol:cloruro de metileno, siendo la temperatura de la columna y del nozzle 30°C) en la etapa 1 y 3. La cuantificación por HPLC se realiza con bomba de gradiente, inyectando 10 µL, temperatura de la columna 30°C, y la composición de la fase móvil es ACN:agua. Las recuperaciones obtenidas para los PAHs oscilan entre un 68 % para el BghiP y el Pir, y 128 % para el BaA, no habiendo diferencias significativas en las dos mezclas de fluidos utilizadas.

MILLER y col., 1993, comparan diferentes solventes de lavado para la recuperación de 5 PAHs (Naftaleno, Fenantreno, Pir, Cri y BbF) mediante SFE, cuyas condiciones de extracción son 400 atm de presión, CO₂ como fluido, columna SS, temperatura 50°C y 15 min. de extracción estática. Con n-heptano, para los tres primeros PAHs las recuperaciones son mayores del 90±1.8%, mientras que para los otros dos son de un 60±1.6% y 74±6.3% respectivamente. Si el lavado se realiza con cloruro de metileno, se mejoran estos últimos a un 82±2.3% y 84±6.2%, manteniendo las de los tres primeros al 90±1.8%.

MEYER and KLEIBÖHMER, 1993, extraen PAHs de sedimentos marinos (SRM HS-3) por SFE "off-line", utilizando CO₂ puro y modificado con tolueno a varias temperaturas, mientras mantienen 400 atm de presión. Obtienen los mejores resultados con CO₂ modificado con tolueno a 140°C durante 75 min., y similares resultados cuando el CO₂ es reemplazado por NO₂. Utilizan como adsorbentes: sílica gel parcialmente desactivada al 3%, Florisil y alúmina. Al sedimento se le añade 1 mL de tolueno como modificador, y se extrae a 120°C, presión 400 atm, durante 15 min. de extracción dinámica con CO₂ puro o NO₂. Las extracciones se llevan a cabo a 60°C (densidad 0.89), 100°C (densidad 0.76) y 140°C (densidad 0.64) durante 75 min. El extracto obtenido es evaporado a sequedad y redisoluto en 1mL de ACN, analizado por HPLC-UV. Utilizan bomba de gradiente con fase móvil ACN:agua, columna C18 termostatzada a 30°C, y flujo 1 mL/min. Los resultados obtenidos muestran que se obtienen recuperaciones mayores al 90±5%. Al aumentar la temperatura de extracción, las recuperaciones son mejores para los PAHs de mayor Pm.

HEATON y col., 1994, describen la separación en 60 min. de los 16 PAHs de la EPA, mediante SFC, desde SRM 1647a, y aplicado a muestras reales (suelo, agua). Una muestra de suelo desecado se extrae por SFE usando CO₂ modificado con 10% de metanol, presión 400 bar y temperatura 100°C durante 60 min. El solvente utilizado para el lavado es DCM. Las muestras de agua se extraen por partición líquido-líquido con DCM. Los resultados obtenidos comparan el análisis por HPLC-UV en 24 min. (flujo 1.5 mL/min., fase móvil

MeCN:agua 50% con gradiente), con SFC en 6 min. (flujo 5 mL/min., fase móvil CO₂:MeOH con gradiente).

LANGENFELD y col., 1994, estudian la extracción de PCBs en sedimentos de río (SRM 1939) y PAHs en partículas de polvo urbano (SRM 1649), por SFE usando CO₂ como fluido con diferentes modificadores (metanol, cloruro de metileno, tolueno, metanol/tolueno, hexano, ACN, anilina, dietilamina y ácido acético) en diferentes proporciones (1 y 10% v/v), para incrementar la eficacia de la extracción. La muestra se extrae durante 5 min. extracción estática y 10 min. extracción dinámica, flujo 1 mL/min. de CO₂, temperatura 80°C, añadiendo directamente sobre la muestra el modificador. El extracto se recoge en 5 mL de cloruro de metileno para los PAHs o acetona para los PCBs, y se analizan por GC-MS. Los resultados muestran que el CO₂ puro no es capaz de extraer los PCBs (32-80%) ni los PAHs (5% para los PAHs de alto Pm y 98% para los de bajo Pm), siendo necesario añadir un modificador. Los PAHs de bajo Pm son mejor extraídos con modificadores como la anilina, ácido acético, ACN, metanol/tolueno, hexano y dietilamina, mientras que los mejores modificadores para extraer los PAHs de alto Pm son el tolueno, dietilamina y el cloruro de metileno. En general, el aumento de la concentración de modificador de 1 a 10% (v/v) tiene pequeños efectos sobre las recuperaciones en los PCBs y en los PAHs de bajo Pm, aunque las recuperaciones de los PAHs de alto Pm se incrementan significativamente.

LÓPEZ-AVILA y col., 1994, aplican un método de SFE para la extracción de PAHs de suelos. Participan tres laboratorios en este estudio, y cada laboratorio extrae tres muestras por triplicado. Las muestras se extraen a 350 atm, 90°C, durante 20 min. de extracción dinámica usando CO₂ como fluido, con flujo 1 y 1.5 mL/min., recogiendo el extracto en 10 mL de DCM que se analiza por GC-MS. Las recuperaciones obtenidas son mayores del 90% cuando presentan concentraciones de 1 mg/kg o más. El valor de la precisión del método entre laboratorios (RSD%) es dependiente de la concentración, en concentraciones mayores a 1 mg/kg se obtienen valores inferiores al 27%, y para concentraciones inferiores a 1 mg/kg obtienen valores entre 19-80%.

REINDL and HÖFLER, 1994, investigan PAHs mediante SFE en muestras de suelos analizándolos por HPLC-UV y HPLC-FL. Las recuperaciones oscilan entre un 88% para el Ant y 101% para el BaP de los 15 componentes estudiados, con presión 40 MPa, temperatura de extracción 80°C, temperatura del restrictor 200°C, fluido CO₂ modificado al 5% con metanol durante 45 min. de extracción dinámica. El extracto se recoge en 15 mL de acetona a 5°C, y se analiza por HPLC en las siguientes condiciones: loop de 10 µL, temperatura termostatzada a 23°C con baño de agua recirculada, flujo 0.5 mL/min., fase móvil ACN:agua con bomba de gradiente. Un 5% de metanol o un 10% de tolueno como modificadores en el fluido supercrítico son necesarios para alcanzar una extracción equivalente por SFE a la extracción por Soxhlet (8 h con acetona). La precisión del procedimiento (RSD%) incluyendo SFE y HPLC es de 6.6 a 10.8 % para todos los componentes. Para muestras reales de suelos, utilizan agentes desecantes (cloruro de magnesio o sulfato de magnesio) para retener el contenido de agua y gránulos de cobre para adsorber compuestos organosulfurados. Similares extracciones son alcanzadas para muestras reales cuando el contenido en metanol en CO₂ se incrementa al 8%.

TENA y col., 1994, realizan un exhaustivo estudio en SFE para 8 PAHs (Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP e IndP) en muestras de suelos analizados por HPLC, comparando sobrecargas en sílica y en suelos pulverizados. Las condiciones de extracción son: densidad 0.9 g/mL, presión 281 bar, flujo 2.5 mL/min., temperatura de la cámara 40°C, tiempo de equilibrio 2 min., tiempo de extracción 60 min., temperatura del nozzle 45°C y temperatura de la columna 40°C. Las condiciones de lavado son: temperatura del nozzle y del trap 60°C, flujo 0.5 mL/min., recogiendo 1.6 mL de ACN. La presencia de modificador es imprescindible para la extracción cuantitativa de los analitos en muestras, pero es innecesario en muestras sobrecargadas. El tipo de modificador que debe de ser añadido a la muestra (hexano, DCM, acetona, metanol y agua) y el volumen necesario (0-400 µL), es optimizado. Las condiciones de análisis del extracto por HPLC son: loop de 20 µL, bomba de gradiente, flujo 1.5 mL/min., fase móvil ACN:agua, y columna Supelcosil LC-PAH. Las recuperaciones obtenidas de sobrecargas de PAHs en sílica son superiores a un 95% para

todos los PAHs, con RSD% inferior a 11%, mientras que las recuperaciones obtenidas en muestras de suelo pulverizado son inferiores al 50%, con RSD% inferior al 8%. La eficacia de la extracción se ve incrementada cuando se utiliza metanol o agua como modificador, fijando una cantidad óptima de 200 μ L.

BARNABAS y col., 1995, extraen los 16 PAHs de la EPA de muestras de suelos mediante SFE con CO₂ puro y modificado con flujo constante de 1 mL/min. Evalúan cuatro parámetros para la recuperación total de los PAHs: presión (100, 150, 200, 250 y 300 kg/cm²), temperatura (40, 55, 70, 85 y 100°C), tiempo de extracción dinámica (10, 22.5, 35, 47.5 y 60 min.) y porcentaje necesario de metanol como modificador (0, 5, 10, 15 y 20%). El extracto preconcentrado en una C18 (SPE) se analiza por GC. El tratamiento estadístico de los resultados, indican que el tiempo de extracción y porcentaje añadido de modificador como fluido, son variables que afectan significativamente a la recuperación de los PAHs, y las condiciones óptimas se establecen en los valores máximos (60 min. y 20% de metanol), mientras que la presión y temperatura no tienen significado estadístico en la recuperación de los PAHs, y mantienen sus valores medios de 200 kg/cm² y 70°C. Estas condiciones son usadas en un estudio de precisión (n=7), obteniendo un valor medio de 458.0 mg/kg \pm 3.1% de PAHs totales. Los resultados se comparan con la extracción por Soxhlet (6 h con 100 mL de cloruro de metileno, n = 5) y microondas (20 min. a 120°C con DCM o acetona, n = 6), recuperando un valor medio de 297.4 mg/kg \pm 10.0 y 422.9 mg/kg \pm 2.4%, respectivamente.

HÖNER y col., 1995, ponen a punto un sistema basado en SFE y SFC para la cuantificación de 17 PAHs en fuel-oil de plantas industriales. Las muestras se recogen en tapones de espuma de poliuretano, y se extraen con CO₂ modificado con 10% de tolueno, presión 40 MPa, temperatura de la columna 130°C, y temperatura del restrictor 150°C, durante 60 min. (2 extracciones de 30 min.). El analito se purifica con sílica gel, y el extracto en n-hexano se evapora bajo corriente de nitrógeno, y se redisuelve en ACN para el posterior análisis por HPLC-FL, en las siguientes condiciones: columna Bakerbond PAH 16-Plus termostatizada a 30°C, flujo 0.5 mL/min. y fase móvil de ACN:agua. Los resultados

obtenidos, muestran que los PAHs de bajo Pm se extraen en 30 min., siendo necesarios 60 min. para los PAHs de alto Pm. Las recuperaciones oscilan entre un 79% y 107% (RSD% inferior al 10%), obteniendo valores inferiores con soxhlet. También realizan pruebas con un sistema de SFC con detector de FL y UV/Vis conectados en serie, loop 20 µL, donde alcanzan límites de detección mucho más bajos.

HÜSERS and KLEIBÖHMER, 1995, indican que la recogida de analitos relativamente volátiles mediante SFE puede ser difícil, observando pérdidas superiores al 30% de PAHs con algunos solventes de lavado, estudiando diferentes solventes orgánicos (hexano, cloruro de metileno y acetona), así como varios adsorbentes: sílica gel 10% y dos distintos octadecisilanos (ODS y dionex), siendo innecesario el paso posterior de purificación cuando se utiliza sílica gel. Se encuentran buenas recuperaciones de los 16 PAHs utilizando CO₂ como fluido de extracción, presión 40 MPa, temperatura de la columna 90°C y del restrictor 150°C, durante 30 min. con CO₂ puro o modificado con 5% de tolueno. El analito se recoge en 10 mL de hexano, cloruro de metileno o acetona a 5°C, y se analiza por HPLC-FL, con bomba cuaternaria de gradiente, columna Bakerbond PAH 16-Plus de 250 mm y precolumna de 20 mm termostatizadas a 30°C, flujo 0.5 mL/min., con fase móvil ACN:agua. Los mejores resultados se encuentran con acetona, recuperaciones comprendidas entre 74.0-91.5 %, con RSD% inferior al 3.6%. Las recuperaciones con cloruro de metileno oscilan del 66.7 a 85.2 % con RSD% inferior al 5.9 %, y con hexano del 69.1 a 88.6 % con RSD% inferior al 18.7%, observando en todos los casos, que en los PAHs de bajo Pm se obtienen las mayores recuperaciones.

KANAGASABAPATHY y col., 1995, evalúan los efectos de diferentes modificadores (metanol, 2-propanol, 2-metoxi-etanol, acetona, cloroformo con 0.7% de etanol, cloruro de metileno, tolueno, clorobenceno, ACN y N,N-dimetil formamida), para la recuperación de 5 PAHs (Acenafteno, Ant, Pir, Cri y BaP) en las siguientes condiciones de SFE: 0.500 mL de modificador, temperatura y presión 100°C y 450 atm, tiempo de extracción estático 15-16 min., tiempo de extracción dinámico 80-109 min. y flujo 0.45-0.94 mL/min., obteniéndose

las mejores recuperaciones con clorobenceno (mayores del 79% con RSD% inferior al 11%). Elegido el modificador estudian diferentes cantidades del mismo (0.5, 1.0 y 1.2 mL) y diferentes temperaturas de extracción (100 y 115°C), a la misma presión y tiempo de extracción estática, con tiempo de extracción dinámica de 86 min. y flujo 0.59-0.78 mL/min., obteniendo las mejores recuperaciones a 100°C y 1.2 mL de clorobenceno (mayores al 83%). Fijadas estas variables, realizan tres estudios de diferentes tiempos de extracción estática y dinámica, a 15 y 86 min., 15 y 65 min. y 25 y 65 min., respectivamente; manteniendo las otras variables, seleccionando 25 y 65 min. Las recuperaciones obtenidas oscilan entre 58.4+6% y un 93.5+2.8%. Los extractos se analizan por GC-MS.

LANGENFELD y col., 1995, extraen polucionantes orgánicos, entre ellos PAHs mediante SFE a diferentes temperaturas (40, 120 y 200°C), y presiones (105, 373 y 650 atm), manteniendo constante la densidad a 0.67 g/mL, y flujo 0.8 mL/min., durante 60 min. El analito se recoge en cloruro de metileno y se analiza por GC-MS. Los resultados muestran que al aumentar la temperatura incrementa la eficacia de extracción del CO₂, seleccionando 200°C y 650 atm, como valores de temperatura y presión, respectivamente.

REIMER and SUAREZ, 1995, comparan dos métodos de extracción por SFE con la extracción por Soxhlet (método de la EPA 3540), para PAHs en suelos determinados por GC-MS. Añaden directamente a la muestra DCM como modificador (método "Manual"), mientras que añaden isooctano:DCM (1:3 v/v) como modificador de fluido supercrítico al CO₂ (método "Bomba"). Las condiciones de extracción para el método "Manual" son: presión 370 atm, temperatura 120°C, 10 min. de extracción estática y 40 min. de extracción dinámica. La temperatura del restrictor es 50°C, y de la columna 10°C, siendo aumentada a 25°C en el lavado con 1 mL de hexano y DCM. Las condiciones de extracción para el método "Bomba" consiste en tres etapas: 1) CO₂ puro a 333 atm de presión, temperatura 120°C, 2 min. de extracción estática y 10 min. de extracción dinámica con temperatura del restrictor 55°C, y de la columna 15°C, siendo aumentadas a 55°C en el lavado con 1.5 mL de isooctano:DCM (1:3 v/v). 2) fluido supercrítico modificado con 1% de metanol y 4% de

DCM, extrayendo 1 y 30 min. de extracción estática y dinámica, manteniendo la temperatura del restrictor a 45°C, sin lavar la columna. 3) 2.5 min. de extracción dinámica manteniendo la temperatura del restrictor a 45°C, y recogiendo 0.9 mL de isooctano:DCM. Las recuperaciones de los PAHs desde sedimentos marinos HS-4, usando ambos métodos, son equivalentes y mejores que usando la extracción por Soxhlet. La precisión media obtenida por SFE es del 16%, similar a la obtenida por Soxhlet, 13%. La exactitud de las concentraciones de PAHs en suelos usando SFE son menores.

YANG y col., 1995, extraen PAHs de materiales de referencia (sedimentos marinos, hollín-diesel, partículas de aire) mediante SFE a 400 atm de presión con CO₂ puro o modificado (10% vol. de metanol, dietilamina, o tolueno añadido directamente a la muestra), temperatura 80 y 200°C durante 15 min. de extracción estática y 15 min. de extracción dinámica, recogiendo el analito en 5 mL de cloruro de metileno, y se analiza por GC-MS. Las extracciones con CO₂ puro se llevan a cabo durante 30 min. en la extracción dinámica, sin mostrar incrementos significativos en las recuperaciones. Se observa un incremento en las recuperaciones de PAHs de los tres tipos de muestra analizada al modificar la temperatura de 80 a 200°C, siendo por tanto la temperatura independiente de la matriz de la muestra. En contraste, los efectos del modificador a ambas temperaturas son dependientes de la matriz de la muestra y del modificador utilizado. En general, con el metanol se obtienen las peores recuperaciones en los tres tipos de muestra a ambas temperaturas. El tolueno y la dietilamina, incrementan las recuperaciones a ambas temperaturas desde partículas de aire, pero sólo la dietilamina incrementa significativamente las recuperaciones en los tres tipos de muestra analizada. La extracción con dietilamina a 200°C presenta las recuperaciones más altas, similares a las obtenidas por soxhlet durante 14-48 horas.

CARDELLICCHIO y col., 1996, describen la aplicación del SFE para la extracción de PAHs (Fenantreno, Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, BaP, BghiP e IndP) de sedimentos marinos. El sedimento deshidratado se extrae a 400 atm de presión, temperatura del restrictor 150°C durante 40 min., modificando la temperatura de extracción (80 y 130°C) y el uso de

modificadores en el CO₂ (metanol, cloruro de metileno, tolueno, freon-22 y dietilamina). El analito se recoge en 10 mL de 1:1 (v/v) de metanol:cloruro de metileno, se purifica por columna cromatográfica que contiene lana de cuarzo, florisil 5% y sulfato sódico anhidro. Los extractos se analizan por GC-MS. Los resultados muestran que al incrementar la temperatura (130°C) aumentan las recuperaciones de los PAHs de bajo Pm, pero las recuperaciones de los PAHs de alto Pm son inferiores al 60%. El uso de CO₂ modificado al 10% con cloruro de metileno es más eficiente que la extracción por soxhlet (150 mL de 1:1 acetona:cloruro de metileno durante 48 h) para todos los PAHs, obtiene recuperaciones entre 84±12% para el IndP y 121±19 % para el Ant. El método aplicado a la extracción de PAHs de material de referencia (SRM 1941), obtiene recuperaciones entre un 90 y 125%; y en muestras de sedimentos marinos del golfo de Taranto (Mar Jónico, en el Sur de Italia), encuentran 115 ng/g de Ant, 1145 ng/g Fl, 1184 ng/g Pir, 878 ng/g BaA, 305 ng/g Cri, 474 ng/g BaP, 11 ng/g BghiP y 44 ng/g IndP.

FERNÁNDEZ y col., 1996, optimizan variables de presión y temperatura para la extracción mediante SFE de los 16 PAHs de la EPA y PCBs de sedimentos desecados, usando tres etapas: la primera con CO₂ puro, la segunda con CO₂ conteniendo 2% (v/v) de metanol, y la tercera con CO₂ modificado al 10% (v/v) de metanol, a 150°C la temperatura del restrictor, flujo 1 mL/min., recogiendo el extracto en 10 mL de hexano que se analiza por GC-MS. Las recuperaciones se incrementan al aumentar la presión (de 80 a 340 atm), y la temperatura (de 50 a 150°C). Mientras que los PAHs de tres y cuatro anillos (Ant, Fl y Pir) se extraen con CO₂, los compuestos de seis anillos (BghiP e IndP) necesitan la tercera etapa. Optimizadas las condiciones de extracción por SFE, las recuperaciones totales de PAHs y de PCBs, son un 17% más altas que las obtenidas por soxhlet (20 h con DCM:metanol 2:1, cuyo extracto hay que purificar con una columna de alúmina neutra). La precisión del SFE y del soxhlet son del 3.7 y 9%, respectivamente.

JÄRVENPÄÄ y col., 1996, extraen 10 PAHs de pescado ahumado y asado mediante SFE y cuantifican por HPLC-UV. Las muestras de pescado deben de estar homogeneizadas y

lío-filizadas, y se mezclan con arena de cuarzo. La extracción se realiza a 350 atm de presión, flujo 1.5-1.7 mL/min., recogiendo el analito en 3 mL de hexano:DCM (3:1) a 5-10°C, que es evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno y redisoluto en 1 mL de hexano. La extracción de PAHs usando arena de cuarzo como adsorbente presenta buenas recuperaciones, comprendidas en un rango del 80 al 100%, con RSD% del 3 al 11%. La extracción de pescado, muestra que el metanol puede ser usado como modificador dinámico, ya que los PAHs de alto Pm son débilmente extraídos con CO₂ puro. El uso de metanol (10%) implica que los compuestos lipofílicos son coeluidos en grandes proporciones, interfiriendo en el análisis de PAHs por HPLC-UV (límites de detección de 2 a 20 ng/mL, para Ant y Pir, respectivamente), por ello, los extractos son purificados usando SPE (alúmina y sílica gel) antes de la determinación cromatográfica.

LIENERT y col., 1996, comparan la extracción por un método convencional, el soxhlet (se extrae dos veces con 70 mL de tolueno durante 6 h), con la extracción por SFE, para 14 PAHs en creosota de madera de árboles. Los extractos se analizan, tras previa purificación, por GC-MS. Para la optimización de las condiciones se realizan sobrecargas en creosota, que se extraen por SFE con CO₂, densidad 0.65 g/mL, temperatura 120°C (presión de 376 bar), flujo 1 mL/min., columna ODS a temperatura de -20°C, durante 10 min. de extracción estática y 50 min. de extracción dinámica. Después de la extracción, los analitos son eluidos con tolueno a 30°C. Para los PAHs de alto Pm, la extracción por SFE muestra ser una buena alternativa al soxhlet, obteniendo unas recuperaciones entre un 80 y 95%.

PLATE and GIESBERG, 1996, extraen 6 PAHs (Fl, BbF, BkF, BaP, BghiP e IndP) de muestras de suelos y sobrecargados por SFE, utilizando CO₂ modificado al 9% con metanol:tolueno (2:1), con un programa de presiones de 20 MPa durante 10 min., 30 MPa durante 10 min. y 40 MPa durante 40 min., temperatura del restrictor 80°C, temperatura de extracción 120°C durante 60 min. de extracción, recogiendo el analito en acetona a 2°C, que se analiza posteriormente por HPLC-FL, con bomba isocrática, fase móvil de ACN:agua (95:5), flujo 0.8 mL/min., columna a 27°C, longitud de onda de emisión 250 nm, y longitud

de onda de excitación 365 nm, y loop de 20 μ L. Las recuperaciones obtenidas oscilan entre un 91% para el IndP, y un 100% para el BkF. Los valores que encuentran en las muestras de suelos expresados en μ g/kg son de 353 para el Fl, 99.5 para el BbF, 39.5 para el BkF, 78.5 para el BaP, ND para el BghiP y 50.0 para el IndP.

DEUSTER y col., 1997, presentan un método de SFE para la extracción de 13 PAHs de suelos industriales. Las condiciones de extracción son 40 MPa de presión, temperatura 90°C y temperatura del restrictor 150°C, diferenciando tres métodos de extracción para evaluar los efectos del modificador: 1) CO₂ durante 120 min. de extracción dinámica, 2) CO₂ modificado con 5% de tolueno durante 120 min. de extracción dinámica, y 3) el modificador se añade directamente en la muestra, 10 min. de extracción estática y 30 min. de extracción dinámica con CO₂. El analito es purificado a través de sílica gel previamente al análisis por HPLC-FL. Las condiciones utilizadas para el análisis son: temperatura 27°C, bomba de gradiente con fase móvil ACN:agua y flujo 0.5 mL/min. Los resultados muestran la eficacia de extracción por SFE al utilizar modificadores polares, directamente en la muestra o como fluido supercrítico.

FRIEDRICH and KLEIBÖHMER, 1997, presentan un método de SFE basado en la técnica de adición directa del modificador. Los analitos de interés son PAHs y policlorados dibenzo-*p*-dioxinas y furanos en muestras de suelos naturales. La muestra de suelo se extrae a 90°C, presión 20 MPa, durante 15 min. de extracción estática, siendo innecesaria la etapa de purificación para los PAHs. El análisis del analito se realiza mediante HPLC-FL. Los mejores resultados se obtienen si se usan mezclas binarias como solvente de extracción (tolueno) con pequeñas trazas (2%) de TFA, que aumentan la eficacia de la extracción.

HOLLENDER y col., 1997, extraen los 16 PAHs de la EPA de matrices ambientales naturales polucionadas (suelos) mediante SFE, usando CO₂ y modificadores (n-hexano, ciclohexano, tolueno, metil*tert*-butil éter, metoxibenceno, DCM, propanona, piridina y metanol) y mezclas de modificadores (metanol- conteniendo dietilamina, 2-aminoetan-1-ol,

ácido acético). Las condiciones de extracción por SFE comienzan a 20 MPa de presión, incrementándose 5 MPa cada 3 min. hasta alcanzar 40 MPa, columna Dionex, y temperatura 90°C durante 39 min. Los extractos se recogen en propanona a 5°C, y se analizan por HPLC-FL-UV, a 23°C con bomba de gradiente, ACN:agua como fase móvil y flujo 0.7 mL/min. Comparando los resultados que se obtienen utilizando DCM por Soxhlet durante 24 h, y usando CO₂ puro por SFE, muestran que los modificadores ácidos o básicos dan mayores recuperaciones de PAHs en todos los casos. La eficacia de la extracción decrece cuando se reduce la polaridad del modificador usado, y cuando se incrementan las concentraciones de cosolvente.

HSIEH and CHANG, 1997, estudian la eficacia de extracción mediante SFE para 5 PAHs (Ant, Pir, Cri, BaP y Perileno), investigando los efectos de diferentes variables en la interacción del analito-matriz. Las extracciones se realizan con 0.7 g/mL de densidad, presión 220-450 bar, temperatura 70, 90, 110 y 140°C durante 5 min. en la extracción estática, recogiendo los analitos en cloruro de metileno. En este estudio utilizan CO₂ puro y modificado con 10% de metanol, cloruro de metileno y tolueno. También estudian dos adsorbentes: XAD (2, 4 y 16) y sílica gel (40 y 100). Las recuperaciones más altas se obtienen utilizando como adsorbente sílica gel, y como la sílica gel 40 tiene mayor superficie de área y menor tamaño de poro que la sílica gel 100, las recuperaciones desde sílica gel 100 son mayores, siendo superiores al 70% en los PAHs estudiados en todas las temperaturas investigadas. Los resultados indican que los principales factores que influyen son las propiedades químicas de la matriz superficial, área de superficie y tamaño de poro, pudiendo influir significativamente en las interacciones del analito-matriz. La polarizabilidad del analito es otro factor importante para estas interacciones. Elevar la temperatura o añadir modificadores puede incrementar las recuperaciones por SFE.

MONSERRATE and OLESIK, 1997, extraen los 16 PAHs de la EPA de polvo de casa usando SFE con CO₂ puro y modificado con metanol en diferentes porcentajes (10, 20, 30 y 40%), estudiando diferentes temperaturas (50, 75 y 100°C). Las condiciones de extracción

son 1 min. de extracción estática, presión 233 atm o 238 atm si se usa bomba binaria y columna SS, recogiendo el analito en diferentes volúmenes (5, 10, 15, 20, 25 y 30 mL de cloruro de metileno). También añaden modificador directamente a la muestra (100 y 200 μ L) y agua (100 μ L), estudiando 75 y 100°C, manteniendo la presión a 233 atm y 10 min. de extracción estática. Los resultados indican que al aumentar la proporción de metanol como modificador del fluido supercrítico, incrementa las recuperaciones y disminuye el tiempo total de extracción. La adición directamente a la muestra de modificador da similares resultados que al utilizarlo como fluido supercrítico, obteniendo un $72\pm 2\%$ y de un $73\pm 4\%$, respectivamente, siendo ambos resultados óptimos .

PICHON y col., 1997, optimizan el uso de modificadores para la extracción de micropolucionantes orgánicos, incluyendo pesticidas y PAHs de suelos y hollín, respectivamente, mediante SFE. Las condiciones de extracción para los seis PAHs investigados (Fenantreno, BaA, BkF, BaP, BghiP e IndP) son 400 atm de presión, temperatura 150°C, durante 40 min. de extracción (10 min. estática y 30 min. dinámica), con CO₂ puro y modificado al 10% con tolueno, ACN y cloruro de metileno. Obtienen unas recuperaciones muy bajas, comprendidas entre un 20% para el BghiP y un 70% para el BaA con CO₂ puro, mejorando las recuperaciones con CO₂ modificado con tolueno, oscilando entre un 25% para el BghiP y 120% para el BaP.

RODRIGUEZ y col., 1997, estudian la técnica de SFE para la separación de 18 PAHs, de muestras de suelos. La muestra, previamente desecada, se somete a tres etapas de extracción con columna ODS a temperatura constante de 30°C. La primera etapa, se lleva a cabo con densidad 0.6 g/mL y temperatura 80°C con CO₂ puro, durante 3.5 min. de equilibrio y 6.8 min. de extracción, extrayendo un 80% de los PAHs de bajo Pm (del Acenafteno al Pir). La segunda etapa, con densidad 0.8 g/mL y temperatura 50°C con CO₂ modificado al 5% con metanol, durante 3.5 min. de equilibrio y 9 min. de extracción, extrayendo un 80% de los PAHs de Pm medio. La tercera y última etapa, con densidad 0.8 g/mL y temperatura 80°C con CO₂ modificado al 5% con metanol, durante 3.5 min. de equilibrio y 9 min. de

extracción, extrayendo el 100% de los PAHs de alto Pm. La cuantificación del extracto se realiza mediante HPLC-FL, termostatzada la columna a 30°C, flujo 1 mL/min. y bomba de gradiente.

WENCLAWIAK y col., 1997, extraen 12 PAHs (Fenantreno, Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, Dibenzo[*a,h*]Ant, BghiP e IndP) en un rango de mg/kg de suelos y partículas de aire. Las extracciones se realizan con tolueno en soxhlet (8h), y por SFE con presión 40.5 MPa, temperatura 150°C, con CO₂ puro y modificado con 5% de tolueno y con DME puro y modificado al 5% con tolueno; recogiendo el analito en 5 mL de hexano, que se purifica con sílica gel, previamente al análisis por HPLC-FL-UV. Las condiciones del análisis se realizan con bomba de gradiente, flujo 1 mL/min. de ACN:agua, y columna termostatzada a 25°C. Los resultados obtenidos mediante las extracciones con DME puro son similares a las obtenidas con tolueno en soxhlet, 32 mg/kg, siendo más bajas las obtenidas con CO₂ puro, 21 mg/kg. Los mejores resultados se obtienen con DME modificado con tolueno (50 mg/kg), seguidos de los obtenidos con CO₂ modificado con tolueno (43 mg/kg).

ALI and COLE, 1998, desarrollan un método de extracción selectivo, aplicado a muestras de tejido biológico (cangrejo) con alto contenido lipídico, el cual representa una interferencia potencial para la extracción de 10 PAHs (Fenantreno, Ant, Fl, Pir, Cri, BaA, Benzo[*a*]fluoranteno, Benzo[*e*]pireno, BaP y Perileno). Utilizan C18 como adsorbente (previamente purificado con hexano, metanol y cloruro de metileno), que retiene los lípidos, y extraen los PAHs, tras previa optimización de las condiciones de SFE: columna SS, 100°C, 350 bar, CO₂ con flujo 1.5 mL/min., durante 5 min. de equilibrio y 25 min. de extracción. Se recoge el extracto en 3 mL de cloruro de metileno y se analiza por GC/MS. Las recuperaciones se encuentran en un rango del 94-100%, mientras que sólo un 9-17% de lípidos son coextraídos.

BENNER, 1998, estudian la extracción de PAHs en cuatro SRMs mediante SFE. Investigan los efectos del fluido de extracción (CO₂, clorodifluorometano (R22), y 1,1,1,2-

tetrafluoroetano (HFC134a)), el uso de fluidos como modificadores (DCM y anilina) y diferentes temperaturas. Para SRM 1649 (polvo urbano), se obtienen excelentes recuperaciones con R22 (90%) para todos los PAHs a 400 atm y 110°C, mientras que usando HFC134a a 400 atm y 125°C, las recuperaciones son inferiores al 80%. Para SRM 1941 y 1944, ambos sedimentos acuáticos con similar composición física y química, la extracción a 400 atm de presión, 150°C durante 15 minutos de extracción estática y 30 min. de extracción dinámica, flujo 1 mL/min. y CO₂ modificado al 10% con DCM, dan lugar a recuperaciones inferiores al 52% para todos los PAHs contenidos en el primero, y mayores del 228% para el segundo. Los resultados desde SRM 1650 (diesel), muestran que se obtienen recuperaciones más bajas que las obtenidas por soxhlet, de un 20% para el BghiP e Indp.

KENNY and OLESIK, 1998a, comparan la extracción mediante SFE con CO₂ puro y modificado (EFE: 60% CO₂-40% metanol y ASE: metanol) para los 16 PAHs de la EPA extraídos de lignita de carbón, analizándolos por GC-MS. Las mejores recuperaciones (47-74%) se obtienen para los de menor Pm, usando CO₂ modificado al 10% con metanol, 70°C y 238 atm. En el grupo de Pm medio se obtienen recuperaciones del 106% usando 100% de CO₂, a 90°C y 238 atm por SFE, y a 70°C, 238 atm utilizando EFE, con ASE se recupera el 100%. En el grupo de los PAHs de alto Pm se obtienen buenas recuperaciones con las condiciones intentadas, pero las condiciones de EFE a 70°C y 238 atm muestran recuperaciones mayores al 85% con RSD% inferior al 5%.

Los mismos autores, 1998b, estudian la ASE para la extracción de los 16 PAHs de la EPA de bituminosos de carbón, y análisis mediante GC. Utilizan como solventes de extracción el metanol, cloruro de metileno y tolueno, a 136 atm durante 1 h a diferentes temperaturas (40-150°C con metanol, y 150°C con tolueno y cloruro de metileno). Ninguna de las técnica de ASE puede extraer cuantitativamente los PAHs de bajo Pm. Los de Pm medio y alto son mejor recuperados con tolueno, obteniendo valores mayores del 80%, pero con RSD% 25%.

LI y col., 1998, adaptan la técnica SFE a un sistema de extracción mediante solvente presurizado para el análisis de diferentes pululantes orgánicos, incluyendo los PAHs, en muestras de suelos. Utilizando 150°C durante 25 min., usando hexano como solvente, y analizando el extracto por GC, las recuperaciones que obtienen son mayores al 75%, con RSD% inferior al 10%.

LUTERMAN y col., 1998a, extraen los 16 PAHs de la EPA, en dos muestras de suelos mediante SFE con modificadores orgánicos. Los modificadores (n-pentano, acetona, tolueno, DCM y metanol) o mezclas de modificadores (metanol conteniendo acetona, tolueno, ácido acético; acetona conteniendo tolueno, atenolamina; n-pentano conteniendo ácido acético), se utilizan en dos concentraciones. Las condiciones de extracción han sido 40 MPa de presión, 90°C la temperatura de extracción, y 180°C la temperatura del restrictor, durante 22 min., recogiendo el extracto en 12 mL de acetona. En general, la eficacia de la extracción se incrementa cuando se reduce la polaridad del modificador, y se aumenta la concentración del co-solvente. La extracción de PAHs de suelos poco polucionados, con alto contenido en ácido húmico, se incrementa favorablemente por el uso de modificadores en comparación con CO₂ puro, usando n-pentano o DCM. Por el contrario, en los suelos más contaminados con productos de aceite mineral, pero con bajo contenido en ácido húmico, la extracción se incrementa sólo un poco por la adición de modificadores frente al CO₂ puro. El extracto ha sido analizado por HPLC, columna termostatzada a 35°C, bomba de gradiente, y flujo 0.6 mL/min.

LUTERMAN y col., 1998b, aplican la técnica de SFE para la extracción de PAHs en muestras de suelos con alto contenido de ácido húmico, usando modificadores y derivatización in situ. Las condiciones de extracción han sido 40 MPa de presión, 90°C de temperatura y el restrictor a 180°C durante 22 min., recogiendo el extracto en acetona. La adición de 10% de metanol incrementa la capacidad extractiva del CO₂ (recuperaciones superiores al 100%) desde la matriz. La derivatización in situ se ha realizado bajo las condiciones dinámicas de SFE, usando BF₃ (1 o 4% v/v) en metanol como modificador.

Comparando los resultados de la extracción con metanol y con BF₃ en metanol, muestran que la adición de BF₃ incrementa las recuperaciones de los PAHs. El extracto ha sido analizado por HPLC-diode array.

MIÉGE y col., 1998, analizan contaminantes orgánicos (15 PAHs) en lodos desecados, comparando las técnicas de extracción de Soxhlet y SFE, y posterior análisis por HPLC-FL, usando columna PAH-16 Plus (250*3 mm) con precolumna J. T. Baker termostatzadas a 45°C, flujo 0.5 mL/min., bomba de gradiente con ACN:agua como fase móvil, inyector Rheodyne de loop 20 µL, obteniendo LD que oscilan entre 0.04 ng para el BbF y BkF y 1.3 ng para el Pir y Cri. Para la confirmación de los resultados, utilizan la técnica UV-diode-array. En la extracción con soxhlet estudian tres solventes (tolueno, ciclohexano y DCM), utilizando 80 mL durante 8 h; las recuperaciones obtenidas con tolueno y ciclohexano (60-110 %) son más altas que las obtenidas con DCM (50-83%), con RSD% 5-20%. En la extracción mediante SFE utilizan CO₂ puro y modificado al 5% con tolueno, DCM o ACN, flujo 1 mL/min., presión 500 atm y temperatura 150°C durante 10 min. estáticamente y 30 min. dinámicamente. Los extractos se recogen en 10 mL de solvente, que posteriormente se evaporan a sequedad, y se redisuelven en ACN y agua, para el análisis por HPLC. Las mejores recuperaciones se obtienen utilizando CO₂ modificado al 5% con tolueno para los PAHs de 5 y 6 anillos (57-112%), con RSD% 5-20%. Las recuperaciones por ambas técnicas de extracción son similares, sin embargo, el SFE es una buena alternativa frente al Soxhlet por reducir el tiempo de extracción y necesitar menor volumen de solvente. Los LD oscilan entre 0.1-1 mg/kg de lodo desecado, con posible confirmación por UV. El método se ha validado usando lodos certificados (CRM N° 088).

BERSET y col., 1999, aplican diferentes métodos de secado (térmico, liofilización, secado químico), de extracción (soxhlet, sonicación, digestión con KOH, agitación mecánica, SFE, ASE) y de detección (HRGC-MS, LC-FL) a muestras de suelos y estudian su influencia con respecto a la determinación de los 16 PAHs de la EPA. El secado térmico y químico no afectan, mientras que la liofilización produce pérdidas de naftaleno. La técnica de extracción

SFE se realiza en tres etapas, de acuerdo con el método de la EPA, pero con pequeñas modificaciones. *Etapa 1:* CO₂ puro con flujo 2 mL/min., temperatura de la cámara 80°C, presión 121 bar, densidad 0.3 g/mL, durante 10 min. de extracción estática y dinámica, temperatura del nozzle 60°C y de la columna 5°C, columna ODS, y lavado de la columna con 0.5 mL de tolueno. *Etapa 2:* CO₂ mezclado con 1% de metanol y 4% de DCM a flujo 4 mL/min., temperatura de la cámara 80°C, presión 339 bar, densidad 0.78 g/mL, durante 10 min. de extracción estática y 30 min. de extracción dinámica, temperatura del nozzle y de la columna 80 °C, sin elución. *Etapa 3:* CO₂ puro a flujo 4 mL/min., temperatura de la cámara 100°C, presión 334 bar, densidad 0.7 g/mL, durante 5 min. de extracción estática y 10 min. de extracción dinámica, temperatura del nozzle y del trap 80 °C, y lavado de la columna con 0.8 mL de tolueno, recogiendo un volumen final de 1.3 mL que se inyecta directamente por GC/MS. La técnica ASE utiliza columna SS a 13.8 MPa y temperatura de 100°C durante 5 min. de calentamiento y 10 min. de extracción, eluyendo con 30 mL de hexano:acetona:tolueno (10:5:1). Ambas técnicas (SFE y ASE) son más eficientes que los métodos clásicos de soxhlet (extracción durante una noche con 160 mL de hexano/acetona:tolueno (10:5:1)) y agitación mecánica (con 100 mL de acetona y 50 mL de éter de petróleo a temperatura ambiente durante 15 min.). Sin embargo, la extracción por soxhlet muestra los coeficientes de variación más pequeños en los resultados. La recuperación de los 16 PAHs después de la saponificación con potasa da resultados más altos, pero con altas variaciones en los PAHs de bajo Pm. La técnica de sonicación (100 mL de hexano:acetona:tolueno (10:5:1) durante 30 min.) es la menos eficiente. Excepto para la técnica de SFE y de agitación, los extractos necesitan un proceso de purificación con sílica gel.

Otras técnicas analíticas

Además de la técnica de SFE, los PAHs han sido extraídos por otros métodos. En los últimos años, se han publicado numerosos trabajos sobre la determinación de PAHs en

material biológico, incluyendo tres procesos: extracción, purificación y análisis. Dichos métodos, niveles de contaminación encontrados, y efectos que producen en algunas especies, se encuentran recogidos en la bibliografía seleccionada, desde 1986.

SOCLO y col., 1986, ponen a punto un procedimiento de análisis para la determinación de los 16 PAHs de la EPA en sedimentos marinos, utilizando como método de cuantificación HPLC-FL. La extracción se realiza con cuatro etapas sucesivas de agitación mecánica de la muestra con cloroformo/tolueno (2:1) a 45°C durante 45 min. Posteriormente el extracto se purifica a través de Sep Pak de Florisil, y el extracto se analiza por HPLC-FL, con bomba isocrática y ACN:agua (85:15) como fase móvil. Las concentraciones encontradas oscilan entre 1 y 102 ng/g.

COCCHIERI y col., 1990, investigan niveles de los 16 PAHs de la EPA en mariscos y pescados de la costa del Golfo de Nápoles. El rango de PAHs (expresados en materia húmeda) es de 185-295 µg/kg en marisco, y de 94-1930 µg/kg en pescado. A nivel de PAHs individuales (expresados en materia húmeda), el Ant es el que se detecta en más bajas concentraciones (2-5 µg/kg en marisco y 2-14 µg/kg expresados en pescado), y los valores más altos corresponden la BaA y BbF (46 µg/kg para ambos en marisco, y 473 y 345 µg/kg en pescado, respectivamente).

HELLOU y col., 1991, analizan 16 PAHs en el contenido graso de muestras de músculo de focas del Canadá. Los lípidos se extraen con cloroformo/metanol y se determinan gravimétricamente. La extracción de PAHs, se realiza por digestión alcohólica con KOH 5 N durante 24 h a 50°C, y el extracto se purifica a través de sílica y alúmina. Los PAHs se analizan por UV/F. Las concentraciones se determinan en términos de aceite crudo y equivalentes de Cri, siguiendo las recomendaciones de la Comisión Internacional Oceanográfica. Los LD para los 16 PAHs de la EPA oscilan entre 0.01 ng/µL de Cri y 0.05 ng/µg de aceite. La cantidad de grasa en hembras es de 15.19±6.19%, más alta que en machos 5.35±1.68%. En general, se encuentran bajos niveles de concentración, inferiores a

1 µg/g en términos de equivalentes de Cri y de 4 µg/g en términos de equivalentes de hidrocarburos del petróleo. Las concentraciones más bajas se encuentran en el tejido fetal. No hay evidencias de bioacumulación con la edad, las concentraciones en focas jóvenes (1-5 años) son más altas que en las focas adultas (6-20 años). Además no hay correlación entre la concentración de PAHs y el contenido graso.

SABER y col., 1991, presentan la aplicación de espectrofluorimetría de alta resolución a baja temperatura (10 °K) (efecto Shpol'skii), para la cuantificación de 13 PAHs (Pir, Cri, BaA, BbF, BjF, BkF, BeP, BaP, Perileno, BghiP, IndP, B(b)Cri y dibenzo(ah)Ant) en sedimentos de lagos, sedimentos y organismos marinos. Obtienen unos LD entre 0.008 ng/mL para BkF y BaP, y 7 ng/mL para Cri. Los resultados obtenidos en las muestras de sedimentos de lagos, indican que la mayor contaminación es debida a la presencia de Pir, BjF, y BghiP, siendo el Perileno el que se presenta en menor concentración. En los sedimentos marinos, predominan el Pir (0.02-70 ng/g), BghiP (0.02-50 ng/g) e IndP (0.07-40 ng/g). Los organismos analizados (almejas y ostras) presentan los niveles más altos de contaminación para Pir (0.4-350 ng/g).

VAN BRUMMELEN y col., 1991, determinan BaP en el isópodo *Porcellio scaber* (machos y hembras), mediante HPLC-FL, con LD de 3.2 ng/g en muestra fresca. Para ello sobrecargan alimento desecado para estos animales con 1, 5, 25 y 125 µg/g de BaP, y después de una semana de aclimatación, se les administra durante 4 semanas. El isópodo se extrae con 25 mL de hexano en soxhlet durante 5 h. El extracto obtenido concentrado en Kuderna-Danish, se purifica con sílica-gel y sulfato sódico, y se analiza por HPLC-FL, con columna termostatzada a 25°C, flujo 1 mL/min., utilizando bomba de gradiente con ACN:agua. Las recuperaciones se realizan con material de referencia que contiene 15 PAHs, obteniendo valores entre 80-110%. Después del ensayo, las concentraciones en los isópodos son aproximadamente 30-40 veces más bajas que en el alimento. No se observan diferencias en las concentraciones de BaP entre machos y hembras. Pero el % de variación es más alto en machos que en hembras.

VAN STRAALEN and VERWEIJ, 1991, amplían el trabajo anterior en el mismo animal (isópodo *Porcellio scaber*), estudiando los efectos metabólicos que produce la exposición al BaP, aplicándolo en un primer ensayo a 110 individuos, 2 sexos (machos y hembras) y 10 replicados; y en un segundo ensayo a 50 individuos, 2 sexos (machos y hembras) y 5 replicados. Los datos son analizados con el programa TOXTAT. Los resultados obtenidos muestran que:

- La mortalidad es mínima en ambos experimentos (6 muertos de 160). El BaP no parece ser tóxico en términos de mortalidad aguda.
- El consumo del alimento contaminado no se ve afectado por la adición al alimento de las diferentes concentraciones de BaP.
- La eficacia de la asimilación se ve influenciada por la población microbiana del intestino.
- El crecimiento de los isópodos varía considerablemente entre los individuos. Hay diferencias marcadas en cuanto al sexo. En los machos, el crecimiento decrece, pero en las hembras se incrementa. La eficacia en el crecimiento a dosis altas se ve afectado significativamente en machos, pero no en hembras.

KENNICUTT y col., 1992a, analizan muestras de suelos de la península Antártica que contienen derivados de hidrocarburos desde diesel, aceites lubricantes y fluido hidráulico. Los suelos desecados se extraen por soxhlet, y el extracto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica de alúmina/sílica gel. Determinan los hidrocarburos alifáticos por GC-FID, y los hidrocarburos aromáticos por GC-MS. La mayoría de la contaminación es debida al derrame de combustible diesel (841-85659 ppb de PAHs totales expresados en materia seca) y PAHs derivados de la combustión (9273-345765 ppb de PAHs totales expresados en materia seca). Los mismos autores (1992b), determinan PAHs en lapas de la misma zona, encontrando altos niveles de contaminación (15-2932 ppb de PAHs totales expresados en materia seca)

McDONALD y col., 1992, determinan PAHs en pescados de la Península Antártica, mediante saponificación con KOH 6N a 35°C durante 18 h. Los extractos se purifican a través de columnas de alúmina/sílica o alúmina/sulfato, y se analizan por GC/MS. Los resultados se expresan como PAHs totales, y los valores se determinan por la suma de los analitos encontrados (Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, Ant, Fenantreno, Dibenzotieno, Fl, Pir y Cri). Utilizan también la técnica de HPLC-FL para determinar los metabolitos encontrados en la bilis: Naftaleno (290/335), Fenantreno (260/380) y BaP (380/430). Las concentraciones más altas de metabolitos biliares y de PAHs en tejidos, se presentan en el pescado capturado cerca del lugar del naufragio del petrolero Bahía Paraíso en 1989. En general, las concentraciones más altas de PAHs se encuentran en el estómago (201-17000 ng/g expresado en materia seca), seguidas del hígado (50-1884 ng/g expresados en materia seca). La polución por PAHs es baja en los pescados capturados en los sitios lejanos de la actividad humana (13-400 ng/g expresado en materia seca). La confirmación de metabolitos de PAHs en la bilis del pescado muestra que la presencia de humanos en la Península Antártica tiene como resultado la exposición del pescado a derivados del petróleo (PAHs), siendo los niveles de BaP encontrados más bajos que el LD.

MOTHERSHEAD and HALE, 1992, exponen cangrejos a altas concentraciones medio ambientales de PAHs no sustituidos. Las muestras de tejido liofilizadas se extraen por soxhlet con DCM durante 48 h, y en una alícuota del extracto determinan gravimétricamente los lípidos. El extracto se purifica a través de una columna de sílica gel activada, y las muestras se analizan por GC-FID, cuyo LQ es de 5 ng/g, y se confirman por GC-MS. La concentración media total de PAHs (Ciclopental(def)fenantreno, Fl y Pir) en el hepatopaneas oscila entre 3369 y 9560 ng/g y en músculo entre 498 y 1380 ng/g.

PERFETTI y col., 1992, modifican un método publicado para la determinación de 12 PAHs (Acenafteno, Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, Dibenz(a,h)Ant, BghiP e IndP) en alimentos marinos. Después de la digestión alcalina de la muestra, el extracto se purifica con alúmina, sílica y C18 y se analiza por HPLC-FL, inyectando 20 µL de alícuota, con flujo

1 mL/min., bomba de gradiente y fase móvil ACN:agua Las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación son 250-420 (Ant, Fl, Pir), 270-390 (BaA, Cris), 290-410 (BbF, BkF, BaP, DBahA) y 300-465 (BghiP e IndP). Las recuperaciones de los 12 PAHs analizados desde 5 matrices diferentes (mejillones, ostras, almejas, cangrejo y salmón) sobrecargados con ppb oscilan entre un 76-94%, siendo más bajas en el salmón. Los LQ oscilan entre un 0.01 a 0.06 ppb en los extractos sin material interferente. Los resultados obtenidos de material de referencia de mejillón (SRM 1647) son buenos.

AL-YAKOOB y col., 1993, determinan las concentraciones de 10 PAHs en partes comestibles de pescado capturado en 1992, después del derrame de petróleo en el Golfo. La extracción se realiza por agitación durante 3 h con metanol/cloroformo, el extracto se purifica a través de alúmina y florisil, y se analiza por GC-MS. Si la muestra presenta un exceso de grasa, se realiza una saponificación durante 2 h. La media total de los PAHs encontrados es 105.3 g/kg, expresados en materia seca, comprendida en un rango de 2.51-563.6 µg/kg, expresado en materia seca. El Pir (ND-144.9 µg/kg) y Fenantreno (ND-100.8 µg/kg) se detectan más frecuentemente (en el 75% de los peces), mientras que el Cri y el BaA presentan los valores más bajos de frecuencia de detección (en el 5% de los peces). Los PAHs que presentan una evidente carcinogenicidad (BaP, Cri y BaA), son los que se encuentran en concentraciones más bajas (ND-7.63, ND-0.05 y ND-0.3 µg/kg en materia seca, respectivamente), y con una menor frecuencia de detección.

SETO y col., 1993, determinan PAHs acumulados en hígado humano de hombres (n=236) y mujeres (n=128), mediante HPLC, examinando su asociación con cáncer de hígado. Una muestra de hígado se homogeniza con etanol y KOH. Posteriormente, se extrae dos veces con hexano, cuyo extracto desecado con sulfato sódico anhidro, se concentra en rotavapor y se purifica a través de alúmina y sílica, y se analiza por HPLC. Las recuperaciones de 50 ng de BaP, BkF y 250 ng de BghiP son de 87.8±5.4%, 87.6±3.1% y 93.7±4.3% (n=4), siendo los LD de 1.0, 2.0 y 5.0 pg, respectivamente. Los valores medios de BaP, BkF y BghiP en el hígado (ng/g, hígado seco) de pacientes japoneses encontrados al realizar la autopsia es de

0.54, 0.44 y 0.87, respectivamente. Cada concentración de PAHs está altamente correlacionada con los otros ($r > 0.83$). Las concentraciones de estos tres PAHs muestran que son mayores en los hombres que en las mujeres y en aquellos que presentan cáncer de hígado. Sólo concentraciones de BghiP en el hígado de hombres fumadores son significativamente más altas ($P < 0.10$) que en el grupo de hombres no fumadores.

THOMPSON y col., 1993, extraen PAHs de ostras mediante saponificación con KOH a 80°C durante 4 h. Los extractos son acidificados con ácido acético glacial y se extraen 3 veces por partición con 50 mL de hexano. Los extractos se purifican usando ácido silícico y alúmina, y se analizan mediante HPLC-FL y HPLC-UV, utilizando columna y precolumna C18 termostatzadas a 30°C, con bomba de gradiente y flujo 1 mL/min. Las recuperaciones obtenidas con NBS 1647a son satisfactorias para el BaA, BbF, BkF, BaP, Dibenz(ah)Ant y BghiP, superiores al 82% con RSD% inferiores al 10%. Mientras que para el Fenantreno, Ant, Fl y Pir, las recuperaciones no son buenas, 46-250% con RSD% inferior al 10%.

DUJMOV y col., 1994, analizan PAHs en pescados y sedimentos recogidas en la costa Adriática. Los sedimentos se someten a saponificación con metanol durante 1.5 h, extracción con n-pentano, y el extracto se purifica a través de alúmina. Las muestras desecadas de pescado, se extraen con metanol en soxhlet. Posteriormente se saponifican los lípidos con KOH, y determinan los lípidos saponificados en el extracto hexánico. La fracción acuosa se acidifica con ácido sulfúrico 1M, se extrae con hexano, y se determinan los lípidos insaponificados en el extracto hexánico. El valor total de lípidos se obtiene de los lípidos saponificados e insaponificados. El extracto hexánico se purifica mediante sílica-gel y alúmina, y se cuantifica por HPLC-FL. Los resultados obtenidos en sedimentos, muestran concentraciones de PAHs en un rango de 0.05 a 2.00 µg equivalente de Cri/g en materia seca. Mientras que los pescados presentan concentraciones más bajas, de 0.02 a 1.00 µg de equivalente de Cri/g en materia seca. La cantidad de lípidos oscila entre 38 y 131 mg/g extraídos desde 33.5 y 33.1 g de muestra.

HELLOU y col., 1994a, determinan 27 PAC incluyendo los 16 PAHs de la EPA en músculo, hígado y ovarios de abadejo del Noroeste del Atlántico. Las muestras se someten a digestión cáustica (50% KOH-MeOH), el extracto se purifica a través de sílica gel, y se analiza por GC-MS. Las muestras de hígado contienen entre 1 y 9 PAC. Sólo el Acenafteno (18 ng/g, peso seco), Fluoreno (28 ng/g) y Cri (22 ng/g) son detectados en la mitad de las muestras de hígado, mientras que el Fluoreno (72 ng/g) se detecta en cada ovario.

HELLOU y col., 1994b, exponen 20 machos de rodaballos a sedimentos contaminados con aceite de petróleo, durante cuatro meses. Las medidas de bioacumulación en términos de fluorescencia o en términos de concentración de aromáticos específicos, se incrementa con la dosis, observándose la bioacumulación en músculo e hígado. De los 27 PAC analizados, predominan los naftalenos alquilados en músculo (90-100%), y sedimentos (30-60%).

VAN DER OOST y col., 1994, analizan los 16 PAHs de la EPA en muestras de sedimentos y anguila recogidas en seis lugares de Amsterdam, con diferentes niveles de agua polucionada. Además, en la anguila determinan metabolitos biliares de PAHs, y aductos hepáticos de PAHs-ADN para evaluar las técnicas de monitorización de exposición a PAHs. La extracción desde tejido de anguila desecado se realiza en soxtec durante 1 h, lavando con hexano:acetona (1:1). El extracto desecado y concentrado se purifica mediante sílica-gel, se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno, se redisuelve en 1 mL de metanol y se analiza por HPLC. El contenido en lípidos de los tejidos se determina por evaporación de una alícuota de la mezcla hexano:acetona recogida en soxtec. Se observa una clara diferencia entre los perfiles de PAHs encontrados en sedimentos y anguilas. Principalmente, PAHs con dos y tres anillos (Naftaleno, Acenafteno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno y Ant) son detectados en anguilas, mientras que en los sedimentos predominan los PAHs de cuatro y cinco anillos (Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP y Dibenz(*a,h*)Ant). Un incremento significativo de niveles de aductos de PAHs-DNA se observa en el hígado de las anguilas procedentes de lugares polucionados. Además, estos parámetros parecen ser biomarcadores sensibles de la exposición a PAHs mutagénicos y carcinogénicos.

HELLOU and UPSHALL, 1995, evalúan la bioacumulación de contaminantes en tejidos de pescado (rodaballo), expuestos a sedimentos polucionados con hidrocarburos de petróleo, durante cuatro meses de invierno. Presentan los resultados usando una multiespectroscopia UV-FL y GC-MS, observando la acumulación de dosis-respuesta en el músculo, en el hígado, y en los metabolitos de la vejiga biliar.

MÄKELÄ and PYY, 1995, estudian los efectos de la temperatura en la retención de 15 PAHs incluidos en la EPA (método 610) utilizando relleno ODS. Utilizan columna ChromSpher PAH (100 mm*3 mm) termostatzada a 23.7 °C (18°C de temperatura ambiente) con bomba de gradiente. El IndP, Dibenz[*a,h*]Ant y BghiP son especialmente propensos a cambiar sus tiempos de retención en fase polimérica ODS con la temperatura. Usando un control de temperatura (incremento de $T < 0.1^{\circ}\text{C}$) obtienen buena reproducibilidad en los tiempos de retención: RSD% menor que 0.07% ($n=10$), para los 15 PAHs. Las longitudes de onda de excitación y de emisión que utilizan y los LQ encontrados para diez de los PAHs son: Ant (250-420) 5 pg, Fl y Pir (240-420) 10 pg, BaA y Cris (260-385) 10 pg, BbF (292-431) 10 pg, BkF (297-410) 5 pg, BaP (250-405) 10 pg, BghiP (291-411) 10 pg e IndP (294-499) 10 pg, respectivamente.

MCDONALD y col., 1995, determinan PAHs (Naftaleno, Fenantreno y BaP) en pescados capturados en la península Antártica. Los niveles de los metabolitos del Naftaleno (51000-140000 ng/g) y Fenantreno (7200-25000 ng/g) se encuentran en niveles más altos en la bilis del pescado, no habiendo diferencias significativas en la concentración del BaP (780-940 ng/g).

SHCHEKATURINA y col., 1995, cuantifican 15 PAHs en mejillones capturados en el Mar Negro (zona crónicamente contaminada y zona relativamente limpia) por GC, previa hidrólisis alcalina. Los resultados muestran que las concentraciones de PAHs en los mejillones capturados en la zona contaminada, son de 6 a 50 veces mayores que en la zona limpia (0.6 a 300 µg/kg), y encuentran los 15 PAHs analizados. Mientras que en la zona

limpia no encuentran BkF, Dibenz(*ah*)Ant ni BghiP, y las concentraciones oscilan entre 0.1 y 6 µg/kg). El PAHs que se encuentra en mayor concentración en ambos lugares es el Fl.

CHEE y col., 1996, utilizan la técnica de microondas-asistido con extracción de solvente (MASE), en un sistema de extracción por microondas (MES) desarrollado para la extracción de PAHs en sedimentos marinos. La comparación con Soxhlet y MASE muestra que ambas técnicas dan resultados comparables en material de referencia (HS-4 y HS-6); siendo necesario menor volumen de solvente y tiempo de extracción con MASE. Los métodos analíticos utilizados son HPLC-UV, HPLC-FL y GC-MS. Las recuperaciones obtenidas en los materiales de referencia son superiores al 73%. Las concentraciones en los sedimentos marinos recogidos en áreas industriales se encuentran en un rango de 0.03 a 0.35 µg/g, expresados en materia seca.

LESKO y col., 1996, capturan hembras de *Ameiurus nebulosus* en tres lagos de Ohio entre el 8 y el 25 de Mayo de 1989, para determinar los efectos de la presencia de sedimentos contaminados en su reproducción. La fecundidad, diámetros de los huevos, longitud y peso de los pescados, y la presencia de anomalías externas se recogen para cada muestra. Las *Ameiurus* procedentes de lugares contaminados son más largas y su fecundidad es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) en los tres ríos. Además, el río más polucionado es el que presenta el mayor número de huevos por hembra, individualmente. La alta frecuencia de anomalías externas que se observan en las *Ameiurus* de zonas contaminadas, no parecen tener influencia sobre la fecundidad. Estos resultados sugieren que la fecundidad de las *Ameiurus* no se ve afectada adversamente en los ecosistemas alterados con la presencia de sedimentos contaminados.

MCDONALD y col., 1996, determinan PAHs y PCBs en tejido de pescado (bilis e hígado) y sedimentos de Texas por HPLC-FL. Los sedimentos se extraen por Soxhlet con cloruro de metileno, purificando el extracto mediante columna cromatográfica de alúmina/sílica gel. Los tejidos de pescado son macerados y extraídos con cloruro de metileno, y purificados a

través de alúmina/sílica gel o alúmina/sulfato sódico. Los niveles de PAHs encontrados en sedimentos oscilan entre 81 y 1060 ng/g y los PCBs son inferiores a 20 ng/g. No hay diferencias significativas en las concentraciones hepáticas de los distintos contaminantes, sin embargo hay diferencias significativas en las concentraciones biliares del Naftaleno, Fenantreno y en los metabolitos del BaP.

PEÑA y col., 1996, examinan el contenido de n-alcanos y PAHs en moluscos (*Osilinus attratus*) mediante hidrólisis alcalina y extracción con n-hexano. La capa orgánica lavada con HCl y neutralizada se concentra en rotavapor. Las fracciones de alifáticos y aromáticos se separan mediante columna cromatográfica de florisil-alúmina-sílica, eluyendo con hexano y n-hexano/DCM (8+2). Ambas fracciones se llevan a sequedad en rotavapor, disolviendo la fracción de alifáticos en n-hexano, y la de aromáticos en tolueno. Ambas fracciones son analizadas por GC-MS. Sólo ocho (Naftaleno, Fl, Pir, BaA, Cri, BbA, Perileno y BaP) de los diecinueve PAHs cuantificados se detectan en las muestras analizadas, y sólo el Naftaleno está presente en casi todas las muestras (23%).

READMAN y col., 1996, extraen PAHs de tejidos de corales (*Porites lutea*) recogidos en la costa del golfo de Kuwait y Arabia Saudí. La muestra se extraen por ultrasonidos con n-hexano/DCM (1:1) durante 45 min. El contenido en lípidos se determina de una alícuota de este extracto. El extracto se purifica a través de sílica gel-alumina-sulfato sódico anhidro, se concentra en rotavapor y se cuantifica por GC/MS. Las concentraciones de PAHs encontradas son extremadamente bajas (0.1 ng/g expresadas en peso seco), y el contenido en lípidos expresados en mg/g oscila entre 0.3 y 11.1.

SMITH y col., 1996, investigan la adsorción de BaP en barbos a partir de sedimentos con diferente contenido en carbón orgánico. Los sedimentos sobrecargados con BaP se aplican durante 6 h a la superficie de distintos tejidos del barbo. En todos ellos, excepto en la sangre y las gónadas, se incrementa la concentración de BaP cuando la concentración de carbón orgánico disminuye.

SISOVIC y col., 1996, extraen PAHs (Ant, Fl, BbF, BkF, BaP, BghiP y B(b)Cri) de muestras de aire recogidas en filtros mediante ultrasonidos con ciclohexano durante 1 hora, evaporando a sequedad con rotavapor a temperatura ambiente. El extracto se redissuelve en ACN y se analiza por HPLC, obteniendo LD que oscilan entre 0.05 ng para BkF y 0.1 ng para Fl. Los valores que encuentran en el aire oscilan entre 1.88 y 35.34 ng/m³ para Ant y Fl, en invierno, y de 0.008 a 0.33 ng/m³ para Ant y Fl, en los meses de verano. Aplicado a muestras de aire del interior de una vivienda obtienen valores similares entre 1.5 y 10.17 ng/m³ para Ant y Fl, en invierno, y de 0.009 a 0.32 ng/m³ para Ant y Fl, en los meses de verano.

UTHE y col., 1996, estiman las concentraciones de PAHs deuterizados en glándulas de tejido digestivo de langosta americana (8 machos y 8 hembras) capturadas en dos zonas diferentes de Canadá, realizando el análisis por GC/MS. Los niveles hallados de PAHs demuestran una gran varianza interanimal, constante en los especímenes capturados al mismo tiempo en el mismo lugar (longitud de caparazón, peso de langosta y peso de la glándula digestiva). Las concentraciones medias de PAHs (ng/g, expresada en materia húmeda), son más altas en machos que en hembras, encontrando las concentraciones más elevadas en Fl, Pir y Cri; por el contrario, el PAHs que se encuentra en menor concentración es BaA. La concentración de PAHs en langosta individualmente, depende generalmente del tamaño, sexo y área de captura.

VAN BRUMMELEN y col., 1996a, analizan 10 PAHs (Fluoreno, Fenantreno, Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP) en cuatro estratos diferentes de suelos a distintas zonas distanciadas de una planta de alto horno. Las muestras se extraen por soxhlet con ACN durante 5 h. Los extractos adicionados de agua destilada se extraen con hexano, se purifica con columna de sílica-gel activada, y se eluye con hexano:DCM (85:15 v/v). El análisis se realiza por HPLC con bomba de gradiente a flujo 1.5 mL/min., loop 20 µL, columna termostaticada a 25°C, con detector de FL y UV-diode array. Las recuperaciones oscilan entre 75 y 100% para los 16 PAHs de la EPA analizados en material de referencia (SRM

1647a). La concentración de los 10 PAHs decrece al aumentar la distancia desde la planta, encontrándose 370 mg/m² a 0.30 Km y 36.9 mg/m² a 6.55 Km. Los diferentes estratos de suelos revelan un enriquecimiento de PAHs con la materia orgánica. Este efecto, se incrementa al aumentar el peso molecular del compuesto, y es usado para estimar la vida media del PAHs en el suelo.

VAN BRUMMELEN y col., 1996b, continúan con el estudio anterior, recogiendo en este caso, tres especies de isópodos y una especie de lombriz. El tejido del animal se extrae mediante soxhlet con hexano durante 4.5 h. Una alícuota del mismo se utiliza para la determinación de lípidos. El extracto se purifica y concentra a través de columna de sílica, y se analiza por HPLC-FL, con bomba de gradiente, flujo 1.5 mL/min., y UV-Diode array para el Fenantreno y Fl. El peso fresco de los animales varía considerablemente entre los lugares de recogida, aunque no hay correlación con la distancia desde el horno de la planta, el contenido en lípidos difiere entre las especies. La concentración de PAHs en las especies decrece al aumentar la distancia a la planta, encontrando elevados niveles de todos los PAHs analizados en lombriz y *Porcellio scaber*, mientras que en las otras dos especies de isópodos sólo se encuentran niveles elevados de Fl y Pir.

VAN BRUMMELEN y col., 1996c, estudian la ecotoxicidad de cinco PAHs (Fluoreno, Fenantreno, Fl, BaA y BaP) en dos especies de isópodos (*Oniscus asellus* y *Porcellio scaber*). Para ello sobrecargan el alimento con PAHs, observando que en el *Porcellio scaber* después de 16 semanas no se presentan efectos adversos de supervivencia (mueren el 6.7%), ni de crecimiento. En el *Oniscus asellus* se observa una mortalidad más alta, un 14% después de 16 semanas de tratamiento, y un 28% después de 48 semanas, así como una pequeña pero significativa reducción en su crecimiento, y una significativa estimulación de la reproducción.

VAN DER KRAAN and VAN WINGERDEN, 1996, utilizan saltamontes para conocer los efectos de la exposición de sus huevos a PAHs en dos ensayos: en el primero, son

expuestos a distintas concentraciones de Fenantreno durante 118 días, y en el segundo a diferentes concentraciones de Ant, Fenantreno, Fl, BaA y Cri durante dos períodos: primero 26 días, y después del día 61 al 83. En ambos ensayos, el 70% de los huevos han anidado. Los resultados demuestran que el tratamiento con PAHs no tiene efectos en la duración del desarrollo del embrión, ni en la nidada de los huevos. Sin embargo, retrasa e inhibe la actividad de la alimentación y anula la fecundidad femenina.

BAUMARD y col., 1997, desarrollan un método rápido, selectivo y sensible para la determinación de PAHs en organismos biológicos. Los tejidos liofilizados se someten a saponificación, con posterior extracción por partición. El extracto se purifica a través de microcolumnas de sílica y alúmina, siendo analizado el extracto final por GC-MS. Las recuperaciones obtenidas usando material de referencia de tejido de mejillón (SRM 1974a) oscilan entre un 63.5 y 113%, con una media de $90\pm 16\%$, y en sobrecargas de mejillón entre el 91 y 109%, obteniendo una media de $100\pm 6\%$.

CLEEMANN y col., 1997, analizan 484 muestras de sedimentos y biota, incluyendo mejillones, peces, pájaros y focas de cuatro localizaciones diferentes de Groenlandia, tres en la costa oeste y una en la costa este. Los análisis realizados incluyen PCBs, HCB, HCH, Dieldrin, DDTs, clordanos, toxafenos y 22 PAHs. Los resultados muestran niveles comparables o ligeramente más bajos que los encontrados en otras regiones del Ártico. Para todas las especies analizadas, se encuentran niveles más altos de PCBs y DDT en la costa oeste que en la costa este. Los organoclorados se encuentran en animales de altos niveles tróficos, mientras que los PAHs muestran los niveles más altos en el hígado de mágol de cuernocorto o trompacorta ($839 \mu\text{g/kg}$, expresados en materia húmeda), y los valores más bajos en grasa de focas ($97 \mu\text{g/kg}$, expresados en materia húmeda).

WANG y col., 1997, analizan PAHs por GC-MS en cuatro pájaros contaminados por aceites desconocidos. Encuentran niveles de Ant, Fl, Pir, BaA, Cri, Bb+kF, BaP, BghiP e IndP en concentraciones que oscilan entre ND para el IndP y $858.7 \mu\text{g/g}$ para el Cri.

BAUMARD y col., 1998, determinan la concentración de PAHs en sedimentos superficiales y mejillones de Francia. Los sedimentos se extraen con microondas con cloruro de metileno, mientras que en los tejidos de mejillón aplican el método puesto a punto en 1997. Los analitos se analizan por GC-MS. Los sedimentos contienen niveles moderados de PAHs (900-4100 ng/g), obteniendo los niveles más bajos a la entrada de la bahía (30 ng/g). Esta polución es principalmente de origen antropogénico. Los mejillones expuestos a sedimentos que contienen niveles de contaminación de PAHs inferiores a 2000 ng/g, acumulan niveles moderados (300-500 ng/g), mientras que si los sedimentos presentan niveles de PAHs superiores a 3000 ng/g, la acumulación es superior a 2000 ng/g.

LODOVICI y col., 1998, cuantifican los niveles de nueve PAHs (Fl, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, Dibenzo(ah)Ant y BghiP), en muestras de aire y en hojas de árbol perenne (*Laurus nobilis*), recogidas en 13 localidades de la región de Toscana (Italia), en verano e invierno. Encuentran en las ciudades más grandes (población mayor a 50000 habitantes) los niveles más altos de PAHs (127-470 µg/kg), seguidos de las ciudades medianas (población entre 10000 y 50000 habitantes) (11-311 µg/kg) y de las pequeñas (población inferior a 10000 habitantes) (56-173 µg/kg). Las hojas recogidas en el centro de grandes ciudades, presentan también los niveles más altos de PAHs, que las muestras de zonas residenciales, donde el tráfico de vehículos es la principal fuente de PAHs.

Los niveles de PAHs en hojas recogidas en invierno en ciudades medias, son considerablemente más altos que los esperados, probablemente debido al uso de las calefacciones domésticas.

WIN y col., 1998, certifican dos aceites de coco como materiales de referencia de (RM 459 y 458) entre trece laboratorios Europeos, analizando seis PAHs (Pir, Cri, BkF, BaP, BghiP e IndP) a niveles de µg/kg. Todos los procedimientos analíticos implican: 1) extracción de PAHs desde la matriz (una alícuota del aceite de coco se extrae con ciclohexano o éter de petróleo, directamente o después de su saponificación); 2) concentración y purificación (con sílica gel desactivada o por cromatografía de permeación), y 3) separación y cuantificación

(por HPLC y GC-MS). Para que los valores puedan ser certificados, los coeficientes de variación entre laboratorios deben de ser inferiores al 15%, y las recuperaciones obtenidas deben de estar comprendidas entre un 50 y 125 %.

CALVO REVUELTA y col., 1999, evalúan los niveles de emisión de los 16 PAHs de la EPA, desde 5 plantas térmicas en España (Teruel, Zaragoza, Almería, León, La Coruña). Las partículas son retenidas en un filtro, que se extrae mediante ultrasonidos durante 30 min. con DCM. Los extractos se purifican a través de columnas de sílica y alúmina, y concentrados se analizan por GC-MS. Los niveles de emisión encontrados son siempre inferiores a 600 ng/m³ para los PAHs totales, encontrando los más altos en La Coruña y Almería. Se observa una presencia dominante de Fluoreno, Fl y Fenantreno

CARLS y col., 1999, exponen huevos de arenque durante 16 días a aceite de petróleo que contiene PAHs. La exposición inicial es de una concentración de 0.7 ppb de PAHs en el agua, causando malformaciones, daños genéticos, mortalidad, disminución del tamaño e inhibición de la natación. Las concentraciones de PAHs inferiores a 0.4 ppb causan respuestas subletales como edemas en la yema e inmadurez, consistente en nidadas prematuras. Los PAHs son extraídos con DCM, purificados con sílica gel-alúmina y los extractos se analizan por HPLC y GC-MS.

HEINTZ, R. A. y col 1999, continúan el trabajo anterior. En este caso, incuban embriones de salmón con distintas concentraciones de PAHs en el agua. Después de 35 días de exposición se observa presencia de PAHs en el embrión. También observan efectos letales por acumulación de los PAHs en los embriones en un 39%; y efectos subletales como deformaciones y displasia oftálmica.

LEE and JONES, 1999, recogen diariamente muestras de aire, entre Marzo y Diciembre de 1994 en una ciudad semirural costera en el noroeste de Inglaterra, analizando la concentración de PCBs y PAHs (Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Ant, Fl, Pir, BaA, Cri,

BbF, BkF, BaP, BghiP y Coroneno). Las muestras se extraen durante 18 h por Soxhlet con hexano, analizando los PAHs por HPLC-FL, y los PCBs por GC-ECD. Las recuperaciones que obtienen para los PAHs oscilan entre un 43 y 83%. La concentración total de PAHs encontrada oscila entre 1.4 y 40 ng/m³, correspondiendo la mayor contribución al Fenantreno, Fluoreno y Fl. Las concentraciones de PAHs muestran una mayor fluctuación en el día a día que los PCBs, destacando que el Fenantreno (PAHs de bajo Pm) está presente en todas las épocas del estudio, mientras que los PAHs de alto Pm no son detectables en los meses de verano. Encuentran una relación positiva entre la temperatura del aire y la concentración que encuentran entre algunos congéneres de PCBs, ciertos homólogos de PCBs, los PAHs de más bajo Pm y el sumatorio de PCBs, mientras que los PAHs de alto Pm muestran una relación negativa con la temperatura. Analizan una serie de parámetros meteorológicos (humedad relativa, lluvia, velocidad y dirección del viento, presión atmosférica), sin encontrar ninguna relación entre ellos y la concentración de PAHs y de PCBs.

MONSON y col., 1999, exponen larvas de ranas durante 48 h a diferentes concentraciones de Fl, realizando los siguientes ensayos: 1) los tejidos se analizan inmediatamente; 2) los tejidos se depuran con agua limpia durante 48 h; 3) los tejidos se someten a un tratamiento de alta intensidad de UV; y 4) los tejidos se someten a un tratamiento de baja intensidad de UV. Los resultados muestran que las larvas de rana bioacumulan Fl en proporción directa a la concentración expuesta, aunque ningún animal muere. Cuando las ranas son colocadas en agua limpia, el Fl es rápidamente depurado, un 80% en 48 h. La exposición a UV de baja intensidad, muestra que aumenta significativamente la toxicidad del Fl, disminuyendo el tiempo de vida media.

OBJETIVO



OBJETIVO

En esta memoria, se pretende realizar un estudio en vísceras de Aves Rapaces, procedentes de los Centros de Recuperación de Fauna Salvaje de la Xunta de Galicia, localizados en Oleiros (La Coruña), El Veral (Lugo), Rodicio (Orense) y Cotorredondo (Pontevedra), para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs),

Estas aves corresponden a especies protegidas y catalogadas de interés especial, lo que dificulta la obtención de especímenes para su estudio científico.

Para ello se ha a puesto a punto un método de extracción mediante fluidos supercríticos (SFE), identificándolos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FL). Se ha determinado el contenido de humedad y grasa en las diferentes vísceras para poder establecer una relación con los compuestos estudiados.

La presencia de estos compuesto en las aves, situadas en los últimos eslabones de la cadena trófica, representa una gran amenaza para el bienestar de los organismos, incluido el hombre, de ahí el gran interés de su utilización como bioindicadores del medio ambiente.

Con los resultados obtenidos, se ha intentado llegar a conclusiones sobre sus implicaciones en el ecosistema.

PARTE EXPERIMENTAL



PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL Y APARATOS

- a) *Extractor de fluidos supercríticos* Hewlett Packard 7680A, controlado por ordenador.
- b) *Espectrofluorímetro* de luminescencia Perkin-Elmer LS-50, equipado con una lámpara pulsante de Xenon, monocromadores de Monk-Gillieson y cubetas de cuarzo de 1 cm, conectado en serie (RS232C) a un ordenador.
- c) *Cromatógrafo de líquidos* SPECTRA-PHYSICS, equipado con bomba isocrática P100, precolumna C-18 Tracer Tr-C-160, columna en fase reversa Hypersil Green PAH (tamaño de partícula de 5 μm ; 0.46 cm x 100 mm), inyector Rheodyne en bucle de 20 μL , detector de Fluorescencia FL2000; integrador DATAJET, conectado vía LABNET a un ordenador. La temperatura de la columna se ha mantenido a 32 °C mediante un baño de agua.
- d) *Microbalanza* modelo SARTORIUS 2405, con seis decimales de precisión (Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela).
- e) *Balanza electrónica* Salter-And ER-120A, con cuatro decimales de precisión.
- f) *Estufa* Heraeus T-340.
- g) *Jeringas* HAMILTON para HPLC.
- h) *Jeringas* de vidrio con adaptador metálico BECTON-DICKINSON.
- i) *Extractor Soxhlet* AFORA.
- j) *Viales de vidrio* de 2 mL para la extracción de SFE, Hewlett Packard(Ref. 5181-3375).
- k) *Placa calefactora* Combimax 230 A.
- l) *Arcón congelador* Edesa de 1000 L.
- m) *Frigorífico* Radiber mod. EC-1200L.
- n) *Lámpara UV Atom 70* con longitudes de onda de 254 y 360 nm.

- ñ) *Cartuchos de celulosa* WHATMAN para extracción Soxhlet (35 mm de diámetro externo y 118 mm de longitud externa).
- o) Otro material de uso corriente en el laboratorio.

2. ORDENADORES y PROGRAMAS

El SFE está conectado al ordenador Hewlett Packard Vectra VL2 4/33se, equipado con software SFE, versión 2.00.

Para la adquisición y tratamiento de los datos espectrofluorimétricos se ha utilizado un ordenador HANDOK HNS (CPU: 12.5 MHz, RAM: 4 MB, disco duro: 43 MB), equipado con el software de aplicaciones luminescentes FLUORESCENCE DATA MANAGER (FLDM), versiones 2.50 y 3.50; y a un ordenador portátil Pentium II ACER EXTENSA 710 TE, con la versión del software en Windows FL WinLab, versión 2.01.

Para la adquisición y tratamiento de los datos cromatográficos se ha usado el ordenador OLIVETTI PCS 44 (CPU: 25 MHz, RAM: 4 MB, disco duro: 85 MB), con el sistema operativo MS-DOS, con entorno Windows versión 3.1, equipado con los software WINNER ON WINDOWS (WOW) (versión 2.0), SPECTRA-PHYSICS CHROMATOGRAM OVERLAY (versión 1.00), DISPLAY (versión 4.05) y SYSTEM SUTABILITY TEST (SST) (versión 4.1).

Para la redacción de la memoria y para la realización de las gráficas se ha utilizado un ordenador Pentium AOC Spectrum (CPU: 120 MHz, RAM: 16 MB y disco duro 1.2 GB) y un ordenador portátil Pentium II ACER EXTENSA 710 TE (CPU: 233 MHz, RAM: 96 MB, disco duro: 4 GB), con el sistema operativo MS-DOS versión 6.20, y entorno Windows 95 y 98, provisto de los software MICROSOFT WORD (versión 97), MICROSOFT EXCEL (versión 97), ACD/ChemSketch (versión 3.5), CHAPMAN & HALL (Diciembre, 1998), Masslab (versión 1.3), HP ChemStation for

LC and L/MS Systems (Rev. A.06.01, 1998), HARVARD GRAPHICS (versión 4.0) y STATGRAPHICS (versión 2.6).

3. REACTIVOS

a) *Patrones de PAHs* ALDRICH

Fluoranteno (CAS: 206-44-0)

- Pireno (CAS: 129-00-0)

- Benzo[*a*]Antraceno (CAS: 56-55-3)

- Criseno (CAS: 218-01-9)

- Benzo[*a*]pireno (CAS: 50-32-8)

b) *Patrones de PAHs* SUGELABOR

-Antraceno (CAS: 120-12-7)

-Benzo[*b*]fluoranteno (CAS: 205-99-2)

-Benzo[*k*]fluoranteno (CAS: 207-08-9)

-Benzo[*ghi*]perileno (CAS: 191-24-2)

-Indeno[1,2,3-*cd*]pireno (CAS: 193-39-5)

(Precaución: Todos estos patrones se consideran tóxicos y, a excepción del BghiP, carcinógenos probables, por lo que deben tenerse en cuenta una serie de precauciones en su manejo. Ver ficha técnica en la Introducción, pags 8 - 26).

c) *Agua de grado HPLC*, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-Q Plus, MILLIPORE.

d) *Acetonitrilo* para cromatografía MERCK, SCHARLAU, CARLO ERBA y J. BAKER.

e) *Metanol* grado HPLC, SCHARLAU.

f) *Ácido clorhídrico* fumante 37% para análisis MERCK.

g) *Bencina de petróleo* para análisis, intervalo de ebullición 40-60°C MERCK.

h) *n-hexano* para análisis de trazas orgánicas, MERCK.

i) *Papeles de filtro* WHATMAN 541.

- j) *Sílica gel 60* para cromatografía en columna MERCK. Tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM).
- k) *Óxido de aluminio 90* MERCK, estandarizado para análisis cromatográfico por adsorción según Brockmann. Tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM).
- l) *Filtros MFS-25*; membrana PTFE; poro:0.5 μ m y diámetro:25 mm.
- m) *CO₂ sifón* de la SEO.
- n) *CO₂ calidad SFC* Tube Plongeur de la SEO.
- ñ) *Nitrógeno* de la SEO N-45.
- o) *Helio* de la SEO N-50.

4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES

Se han preparado soluciones madre en hexano de los PAHs estudiados, de 100 mg/L de concentración, soluciones de trabajo de 100 μ g/L (el IndP de 1004 μ g/L), y se han mantenido refrigeradas a 4°C. A partir de éstas, se han preparado las soluciones de trabajo en ACN, evaporando a sequedad bajo corriente de nitrógeno y redisolviendo en ACN, excepto para el Ant que se ha preparado en ACN en las mismas concentraciones, ya que se degrada por evaporación a sequedad.

5. PROTOCOLO ANALÍTICO

5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se han analizado vísceras de 23 aves rapaces catalogadas de interés especial (nocturnas y diurnas), las cuales han sido suministradas ya diseccionadas y congeladas por los cuatro Centro de Fauna Salvaje de Galicia localizados en Oleiros (La Coruña), El Veral (Lugo), Rodicio (Orense) y Cotorredondo (Pontevedra), a través del Departamento de Parasitología, del Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios de la Universidad de Santiago de Compostela. En la Tabla 1 y Fig. 30, se recogen las

características aportadas por dicho Centro para las aves estudiadas: 10 diurnas (*Buteo buteo* o Ratonero), y 13 nocturnas (2 *Strix aluco* o Cárabo y 11 *Tyto alba* o Lechuza), con un total de 133 vísceras (hígado, corazón, pulmón, riñón, músculo e intestino).

Tabla 4. Características de las muestras analizadas para la determinación de PAHs.

Muestra	Provincia	Lugar de recogida	Sexo	Edad	Fecha de muerte	Causa de muerte
⁽¹⁾ <i>Buteo buteo</i> R-1	La Coruña	Oleiros	H	A	25/12/93	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-2	La Coruña	Noya	M	A	01/03/94	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-3	La Coruña	Negreira	M	A	30/11/94	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-4	La Coruña	Puebla del Caramiñal	H	A	06/03/95	Disparo
⁽²⁾ <i>Buteo buteo</i> R-5	Lugo	Sarria	M	A	15/10/93	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-6	Orense	Castro Caldelas	H	A	14/04/94	Disparo*
<i>Buteo buteo</i> R-7	Orense	Castro Caldelas	M	Inm	05/12/93	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-8	Orense	Castro Caldelas	M	A	24/04/94	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-9	Pontevedra	Salvaterra	H	A	07/12/93	Disparo
<i>Buteo buteo</i> R-10	Pontevedra	Bueu	M	A	18/12/93	Disparo
<i>Strix aluco</i> C-1	Pontevedra	Vigo	M	A	19/03/94	Golpeado
<i>Strix aluco</i> C-2	Pontevedra	Las Nieves	H	A	27/04/96	Desconocida
<i>Tyto alba</i> L-1	La Coruña	Muros	H	Inm	02/11/85	Atropello
⁽³⁾ <i>Tyto alba</i> L-2	La Coruña	Santiago	M	A	26/08/91	Golpeado
<i>Tyto alba</i> L-3	Orense	Orense	H	A	07/11/93	Desconocida
<i>Tyto alba</i> L-4	Orense	Orense	M	A	10/01/95	Golpeado
<i>Tyto alba</i> L-5	Pontevedra	Vigo	H	A	05/11/94	Atropello
<i>Tyto alba</i> L-6	Pontevedra	La Guardia	M	A	18/11/94	Atropello
<i>Tyto alba</i> L-7	Pontevedra	Sangenjo	H	A	02/11/94	Atropello
<i>Tyto alba</i> L-8	Pontevedra	Cangas	H	A	25/11/94	Atropello
<i>Tyto alba</i> L-9	Pontevedra	Pontevedra	M	A	21/12/95	Disparo
<i>Tyto alba</i> L-10	Pontevedra	Bueu	H	A	15/04/96	Disparo
<i>Tyto alba</i> L-11	Pontevedra	Moaña	H	A	02/11/94	Atropello

*Sacrificado por irrecuperable; H = Hembra; M = Macho; A = Adulto; Inm = Inmaduro.

⁽¹⁾Se dispone de riñón, corazón y pulmón.

⁽²⁾No se dispone de riñón.

⁽³⁾Se dispone de músculo

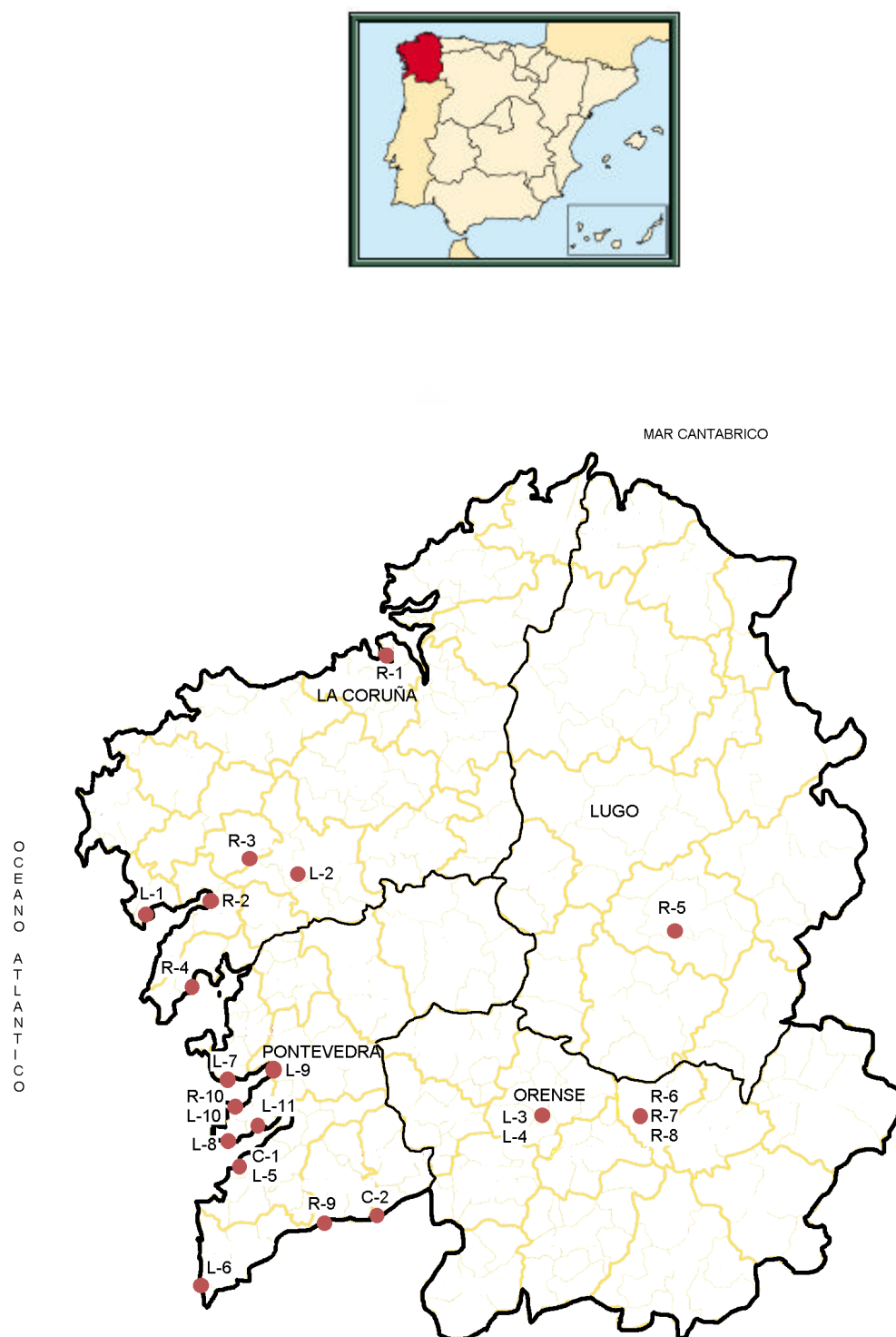


Fig. 30. Mapa de localización de las muestras analizadas.

5.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Se toma una alícuota de la víscera y se pesa en fresco en placa Petri de vidrio, previamente tarada. Se tritura y se somete a desecación en estufa a 70°C hasta peso constante, necesitándose un total de 14 o 20 horas, según el peso de la muestra fresca (menor o mayor de un gramo, respectivamente). Una vez desecada, la muestra se pesa, calculándose por diferencia el % de humedad.

5.3. DETERMINACIÓN DE GRASA DE LA MUESTRA

Se ha calculado según el Método Oficial (BOE, 29-8-79).

Con los datos de humedad de la muestra se expresan los resultados en % grasa en materia seca.

5.4. EXTRACCIÓN DE PAHs

Para la extracción mediante SFE se ha utilizado el modelo HP7680A (Fig. 31).

Se ha utilizado anhídrido carbónico supercrítico como fluido de extracción (Fig. 32), y sílica activada al 15% como adsorbente, previamente purificada durante 6 horas en soxhlet con ACN MERCK.

La sílica una vez purificada, se ha introducido en la estufa a 100 °C durante 4 horas, enfriándola en desecador (proceso de activación). A continuación se ha desactivado parcialmente mediante la adición de un 15% de agua MILLI-Q, y posterior homogeneización por agitación manual durante quince minutos.

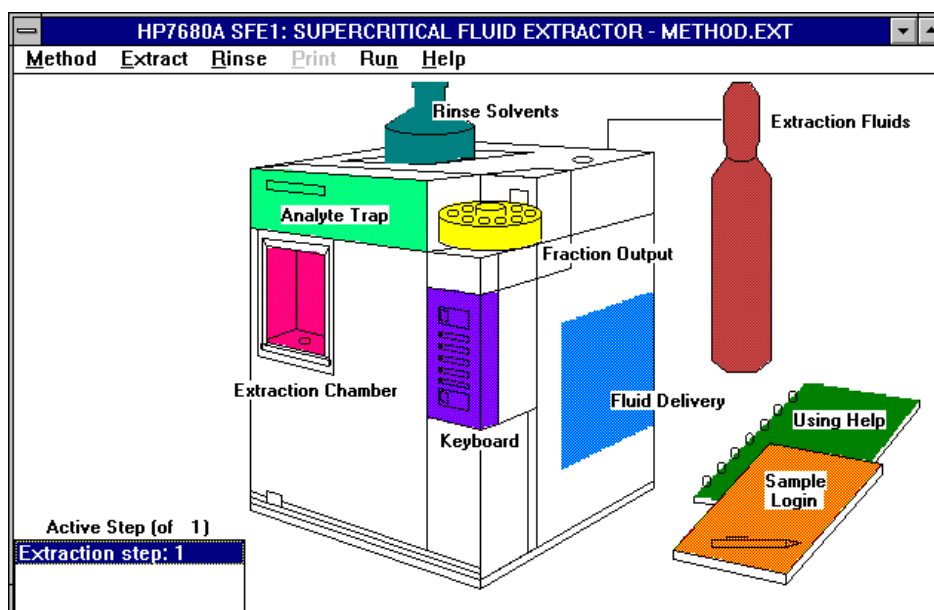


Fig. 31. Módulo de extracción del HP7680A.

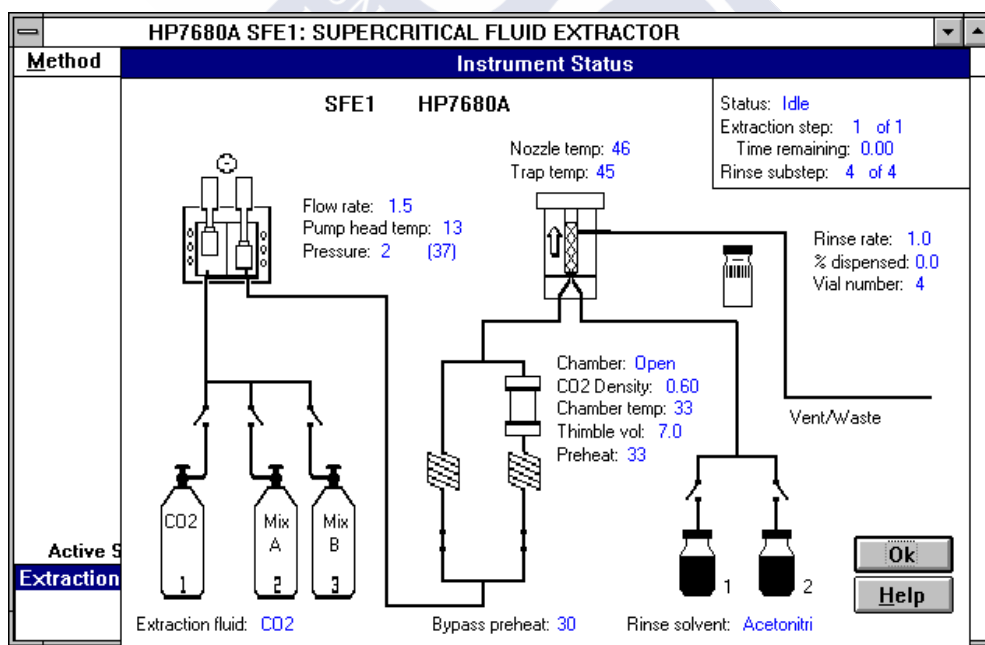


Fig. 32. Esquema básico del extractor supercrítico HP 7680A

Debido a la pequeña cantidad de muestra disponible, los estudios preliminares se han realizado sobre hígado de pollo comercial, para posteriormente repetir los mismos ensayos con las muestras objeto de estudio. La muestra previamente desecada, se pulveriza en un molinillo para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

En una cápsula se pesan 2 g de sílica parcialmente desactivada al 15%, se añade la muestra desecada pulverizada, y se mezcla bien.

En el "thimble" o vaso de extracción se coloca un papel de filtro (Whatman 541) del mismo diámetro del vaso de extracción, previamente al cierre del tapón. Se introduce la mezcla de la muestra con la sílica parcialmente desactivada al 15% y sobre ella 1 g de sílica parcialmente desactivada al 15%, y 200µL de metanol como modificador. A continuación se pone otro papel de filtro (Whatman 541), igual que en el extremo inferior y se cierra.

Las condiciones de trabajo han sido las siguientes (Fig. 33):

HP7680A SFE1: SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTOR

Step Setpoints

Setpoints For Extraction Step: 1 of 1

Extraction Chamber		Fraction Output	
Sample name:		#	Solvent
Sample ID:		Vol.	Rate
Chamber temperature:	100 C	NozT	TrapT
Equilibration time:	10.00 min.	U#	
Extraction time:	50.00 min.	1	Acetonitri 1.5 1.0 50 50 1
Thimble size:	7.0 ml	2	Acetonitri 1.5 1.0 50 50 2
Thimble volumes swept:	16.5	3	Acetonitri 1.5 1.0 50 50 3
		4	Acetonitri 1.5 1.0 50 50 4

Analyte Trap		Fluid Delivery	
Nozzle temperature:	75 C	CO2 Density:	0.60 g/ml
Trap temperature:	75 C	Pressure:	256 bar (3717 psia)
Trap packing:	ODS	Flow rate:	1.5 ml/min.
Void volume compensation:	1.0 ml	Extraction fluid:	CO2

To edit, click in desired box

Next Step Previous Step Ok Help

Fig.33. Condiciones del SFE para realizar la extracción de PAHs.

Se recoge el ACN de lavado de tres viales y se lleva a 5 mL. Este eluato se filtra a través de un filtro MFS-25 (tamaño de poro 0.5 μm), y a continuación se analiza por HPLC-FL.

6. ANÁLISIS

6.1. ANÁLISIS ESPECTROFLUORIMETRICO

Además de los espectros de excitación y de emisión convencionales, en los que uno de los monocromadores permanece fijo mientras el otro varía a lo largo de longitudes de onda, existe otra modalidad sincrónica, que resulta de efectuar un barrido simultáneo de las longitudes de onda de excitación y de emisión con un intervalo de longitud de onda constante, $\Delta\lambda$, entre ellas, aumentando la selectividad y resolución.

Para la optimización de las longitudes de onda de los diez PAHs estudiados en ACN, se han realizado 50 espectros sincrónicos de cada PAH individualmente en las siguientes condiciones de trabajo:

- **Rango espectral:** 200-500 nm.
- **Rendija de excitación:** 5 nm.
- **Rendija de emisión:** 5 nm.
- **Velocidad de barrido:** 240 nm/minuto.
- **Intervalo de longitud de onda inicial:** 10 nm.
- **Incremento:** 5nm.
- **Numero de registros:** 50.

De acuerdo con los valores asignados a estos tres últimos parámetros (intervalo, incremento y nº de registros), el intervalo de longitud de onda correspondiente a cada uno de los 50 registros vendrá dado por la fórmula:

$$\Delta\lambda = 10 + 5 * (n-1),$$

donde n es el número de registro (entre 1 y 50).

Una vez obtenidos los 50 espectros sincrónicos, se realizan los diagramas tridimensionales y mapas de contorno con el programa FL WinLab. Se selecciona la longitud de onda de excitación del compuesto analizado, que corresponde a la mayor intensidad de Fluorescencia, y mediante el $\Delta\lambda$ correspondiente (nº de sincron), se calcula la longitud óptima de emisión. Las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas, los intervalos de longitud de onda seleccionados, y el nº de sincron de los PAHs estudiados en ACN, se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Longitudes de onda de excitación óptimas (nm), $\Delta\lambda$ (nm) y nº sincron, para los diez PAHs analizados en ACN.

PAHs	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	nº sincron
Ant	250	400	150	29
Fl	287	457	170	33
Pir	334	374	40	7
BaA	288	388	100	19
Cri	269	364	95	18
BbF	300	445	145	28
BkF	307	412	105	20
BaP	296	406	110	21
BghiP	298	408	110	21
IndP	305	470	165	32

Seleccionadas las longitudes de onda óptimas para cada PAH en ACN, se realizan posteriormente sus espectros de excitación y emisión.

6.2. HPLC-FL

Una alícuota de 20 μL de la solución de 5 mL ACN se inyecta en HPLC-FL, utilizando como fase móvil ACN: agua (85:15), a flujo constante de 0.5 mL/min., "range" de 0.05 y temperatura constante de la columna a 32°C.

Para la cuantificación de los diez PAHs estudiados, se utilizan las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) incluidas en la Tabla 6. Se han utilizado las longitudes óptimas sólo para cuatro de los diez PAHs estudiados, siendo necesario realizar dos inyecciones para la proximidad en los tiempos de retención de algunos de ellos que dificultan el cambio de λ , seleccionando entonces longitudes de onda que permiten obtener una buena resolución.

La recta de calibrado para cada PAH estudiado, se ha calculado por análisis de regresión entre diferentes rangos de concentraciones ($\mu\text{g/L}$ en ACN) (Tabla 6), medidas por triplicado, frente a las áreas calculadas de los picos en las condiciones de trabajo (Tabla 18).

Tabla 6. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) utilizadas para la cuantificación de los diez PAHs analizados.

PAHs	Tiempo de retención	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Resolución HPLC-FL	Rango Recta de calibrado
Ant	5.54	250	400	Inyección 1	0.1, 0.5, 1, 2 y 3
Fl	6.29	286	456	Inyección 2	1.3, 2, 3, 4 y 5
Pir	7.20	250	400	Inyección 1	0.3, 0.5, 1, 2 y 3
BaA	9.91	270	390	Inyección 1	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
Cri	11.22	270	390	Inyección 1	1, 2, 3, 4 y 5
BbF	15.72	296	426	Inyección 1	1, 2, 3, 4 y 5
BkF	18.80	296	406	Inyección 2	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BaP	22.69	296	406	Inyección 1	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BghiP	34.09	296	426	Inyección 2	1, 2, 3, 4 y 5
IndP	38.20	304	470	Inyección 1	*

* Por tener un LQ de 31 $\mu\text{g/L}$ no se ha hecho su recta (Tabla 14)

6.2.1. ADQUISICION Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS

La captura automática de los datos se realiza mediante un ordenador personal equipado con el programa Winner para Windows (WOW) conectado vía LABNET con el integrador.

Para la cuantificación de los diez PAHs estudiados se han utilizado las rectas de calibrado calculadas en áreas en diferentes rangos de concentración ($\mu\text{g/L}$), para cada PAH (Tabla 6).

6.2.2. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

La presencia de los diez PAHs identificados mediante HPLC-FL con las λ_{exc} y λ_{em} incluidas en la Tabla 6, se han confirmado mediante los siguientes procesos:

1) Por **HPLC-FL**, en idénticas condiciones de trabajo se inyecta una alícuota de 20 μL de la solución de 5 mL de ACN, pero cambiando las λ_{exc} y λ_{em} citadas en la Tabla 6, por otras distintas recogidas en la Tabla 7, excepto para el IndP.

Las rectas de calibrado se han calculado así mismo por análisis de regresión, medidas por triplicado entre las concentraciones ($\mu\text{g/L}$ en ACN) de los PAHs, frente a las áreas calculadas en las condiciones de trabajo.

Tabla 7. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) utilizadas para la confirmación de los diez PAHs analizados.

PAHs	λ_{exc}	λ_{em}	Resolución HPLC-FL	Rango Recta de calibrado
Ant	286	456	Inyección 2	No hay respuesta
Fl	250	400	Inyección 1	No hay respuesta
Pir	286	456	Inyección 2	No hay respuesta
BaA	266	380	Inyección 2	0.5, 1, 2 y 3
Cri	266	380	Inyección 2	1, 2, 3, 4 y 5
BbF	296	406	Inyección 2	2, 3, 4 y 5
BkF	296	426	Inyección 1	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BaP	296	426	Inyección 2	1, 2 y 3
BghiP	296	406	Inyección 1	2, 3, 4 y 5

2) **Relación de área:** se calcula a partir de las áreas obtenidas para las longitudes de onda utilizadas en la cuantificación y confirmación. Esos valores deben ser constantes para cada PAH, y se encuentran recogidos en la Tabla 8 (n=6).

Tabla 8. Relación de las áreas obtenidas en las longitudes de onda de cuantificación y confirmación para los PAHs.

PAHs	Relación Área	RSD%
Ant	No hay respuesta	
Fl	No hay respuesta	
Pir	No hay respuesta	
BaA	1.46	2.43
Cri	0.70	2.61
BbF	1.69	1.26
BkF	1.01	1.16
BaP	1.45	0.83
BghiP	0.87	1.80

3) Mediante la realización en HPLC-FL de **espectros en modo sincron** (Tabla 9) sobre el pico que se eluye, sin parar el barrido.

Para poder aplicar este método de confirmación a las muestras analizadas, es necesario concentrar unas diez veces el extracto obtenido, ya que las concentraciones de los analitos objeto de estudio, deben ser mucho más elevadas que las utilizadas para su cuantificación.

Las condiciones de trabajo fijadas han sido para el rango espectral: 100 nm, y para el intervalo de lectura: 2 nm, en todos los casos.

Tabla 9. λ_{exc} y λ_{em} iniciales para realizar los espectros en modo sincron mediante HPLC-FL.

PAHs	λ_{exc}	λ_{em}
Ant	200	350
Fl	236	406
Pir	284	324
BaA	238	338
Cri	218	314
BbF	250	394
BkF	256	362
BaP	246	356
BghiP	248	358
IndP	254	420

Completando el barrido mediante el "replay" se recupera el espectro almacenado, siendo identificado en función del tiempo en el que se ha iniciado ("runtime") durante el barrido de muestra.

4) **Degradación de PAHs por radiación Ultravioleta a 254 nm:** se introducen 0.6 mL de una solución conteniendo los diez PAHs estudiados en ACN, en una concentración de 3 µg/L de Ant, Pir, BaA, BkF y BaP, 5 µg/L de Fl, Cri, BbF y BghiP, y 35 µg/L de IndP en viales de vidrio de 1 mL desprovistos de cápsulas de cierre. Se colocan en fila de uno y se hace incidir sobre ellos la luz directamente durante 16 horas (Fig. 34).

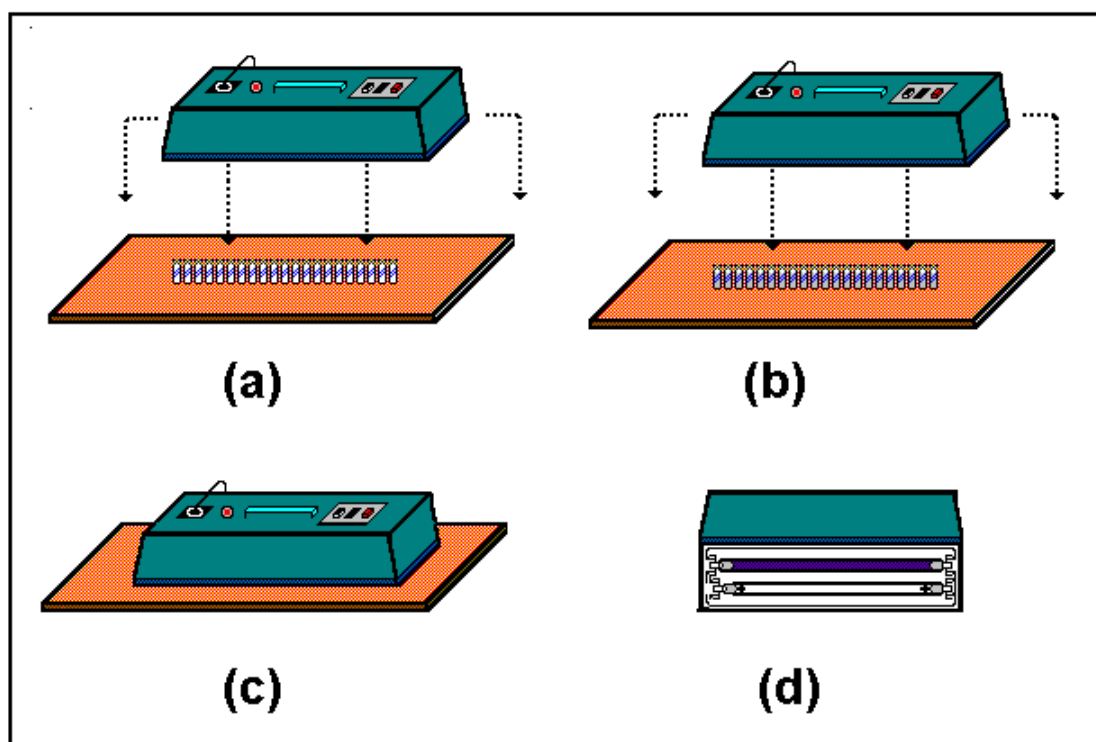


Fig. 34. Lámpara UV: a) lámpara con viales vacíos, b) lámpara con viales llenos, c) vista lateral de la lámpara, d) vista inferior de la lámpara.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras descritas en la Tabla 4, consisten en alícuotas muy diferentes de vísceras congeladas, envueltas cada una por separado en papel de aluminio, y a su vez clasificadas por cada ave en bolsas de plástico. Para su estudio se han utilizado cantidades variables debido al diferente tamaño de las muestras, tomando siempre que ha sido posible 0.5 g (Furton y Lin, 1993 y Gere y col., 1993).

Debido a la dificultad de determinar todos los parámetros de estudio en una misma muestra, se han decidido dedicar un total de 87 vísceras (Tabla 10), para la determinación del % de humedad y % de grasa en materia seca, de las tres especies de aves rapaces, nocturnas y diurnas, objeto de este estudio: *Buteo buteo* (Ratonero), *Strix aluco* (Cárabo) y *Tyto alba* (Lechuza); correspondiendo 39 vísceras a Hembras Adultas, y 48 vísceras a Machos Adultos. Se han seleccionado vísceras de las que no se dispone de todos los datos identificativos (Causa de muerte, Provincia, lugar de recogida...), y que no permitirían realizar estudios estadísticos sobre los resultados encontrados de PAHs. Los parámetros objeto de estudio, y el % de humedad se ha determinado en 133 muestras.

1. HUMEDAD

Inicialmente, se ha hecho un estudio con muestras comerciales de hígado de pollo fresco para conocer el número de horas que deben estar en estufa a temperatura constante de 70°C, para alcanzar peso constante (la diferencia de pesada entre dos determinaciones simultáneas, no debe de ser superior a 0.1 g de agua por 100 g de muestra (0,1%)). Se han hecho tres determinaciones sobre la misma muestra, con tres cantidades diferentes de pesada en muestra fresca: 0.50, 2 y 5 g. La temperatura se ha fijado a 70°C, para evitar modificaciones en la grasa, ya que las sustancias objeto de este estudio presentan un alto carácter lipofílico y a temperaturas más altas se observaba una separación de la misma. El estudio se ha empezado en 12 horas, incrementándose cada dos horas hasta un total de 24, alcanzándose peso constante en:

- 14 horas si la muestra es inferior a 1g.
- 20 horas si la muestra es superior a 1g.

Además de las 87 muestras citadas anteriormente, la humedad se ha determinado en las 133 muestras objeto de análisis.

Tabla 10. Características de las 87 vísceras utilizadas para la determinación del % de grasa y humedad.

Muestra	Provincia	Lugar de recogida	Sexo	Edad	Fecha de muerte	Causa de muerte
<i>Buteo buteo</i> GR-1			H	A		
<i>Buteo buteo</i> GR-2	Pontevedra	Bueu	H	A	12/09/95	Enfermedad
<i>Buteo buteo</i> GR-3			M	A	3/08/93	Enfermedad
<i>Buteo buteo</i> GR-4			M	A		Disparo
<i>Buteo buteo</i> GR-5			M	A		Disparo
<i>Buteo buteo</i> GR-6	Lugo	Sarria	M	A	15/10/93	Disparo
<i>Strix aluco</i> GC-1			H	A	11/12/91	
<i>Strix aluco</i> GC-2			H	A		
<i>Strix aluco</i> GC-3			M	A		
<i>Strix aluco</i> GC-4	Pontevedra	Vigo	M	A	20/03/94	
<i>Tyto Alba</i> GL-1-		Covelo	H	A	26/11/95	Golpeado
<i>Tyto Alba</i> GL-2		Castrelo de Miño	H	A		Atropello
<i>Tyto Alba</i> GL-3	Pontevedra	Moaña	H	A	02/11/94	Atropello
<i>Tyto Alba</i> GL-4			M	A		
<i>Tyto Alba</i> GL-5			M	A		Golpeado
<i>Tyto Alba</i> GL-6			M	A	6/01/94	

2. GRASA

A los resultados obtenidos de extraer las muestras según el Método Oficial (BOE, 29-8-79), se les ha aplicado el programa STATGRAPHICS, recogiendo en la Tabla 11 las variables estadísticas para el contenido en humedad en las 220 (87 +133) vísceras analizadas y % grasa (87 vísceras) expresado en materia seca.

Tabla 11. Variables estadísticas del % de humedad y de grasa.

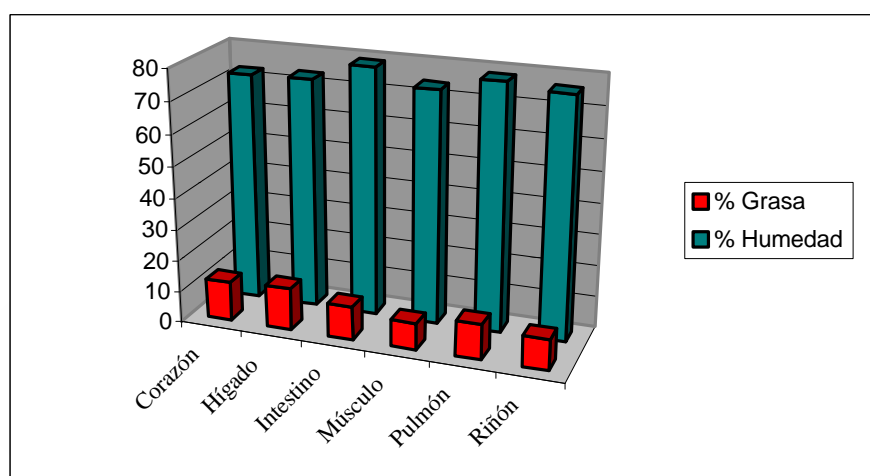
	% Humedad n=220	% grasa n=87
Media	75.77	11.15
Desviación estándar	4.580	7.105
Mediana	75.87	9.430
Moda	75.78	9.430
Varianza	20.98	50.49
Mínimo	57.52	1.240
Máximo	86.88	39.44
Cuartil inferior	72.35	6.270
Cuartil superior	78.97	13.54
Asimetría	-0.2710	1.684
Aplastamiento	0.6570	3.232

El valor medio de humedad es de 75.77% con una desviación estándar del 4.580%, observando que el cuartil inferior de las muestras tienen un valor por debajo de 72.35%, y el cuartil superior de las muestras de 78.97%. La distribución es normal, es decir, presenta una distribución simétrica con un factor de aplastamiento de 0.657. Respecto al valor medio de % grasa en materia seca, es de 11.15% con una desviación estándar de 7.105%, repitiéndose el valor de 9.430%. En el cuartil inferior de las muestras se encuentra un valor por debajo de 6.270%, mientras que en el cuartil superior es de 13.54%. También presenta una distribución simétrica, con un factor de aplastamiento de 3.232.

Se ha aplicado el análisis de la varianza (intervalo 95% y nivel de significación 0.05) con el fin de dilucidar si existen diferencias significativas en función del tipo de víscera (Tabla 12, Fig. 35), de la especie (Tabla 13, Fig. 36) o del sexo (Tabla 14, Fig. 37).

Tabla 12. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del tipo de víscera.

	Corazón	Hígado	Intestino	Músculo	Pulmón	Riñón
n° de muestras	16	16	10	14	15	16
% de Grasa	12.71	13.49	10.60	8.460	11.29	9.810
n° de muestras	39	38	32	35	38	38
%de humedad	72.91	73.41	78.95	74.04	78.26	76.45

**Fig. 35.** Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del tipo de víscera.

Los resultados obtenidos en la Tabla 12 y Fig. 35, ponen de manifiesto que el % de grasa expresado en materia seca y % de humedad en las seis vísceras analizadas, no presentan diferencias significativas. Se observa que poseen mayor cantidad de grasa, el hígado y corazón, con la correspondiente menor cantidad de humedad.

Tabla 13. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función de la especie.

	Ratonero	Cárabo	Lechuza
n° de muestras	32	21	34
% Grasa	11.54	9.810	11.61
n° de muestra	88	33	99
% Humedad	75.82	75.04	75.96

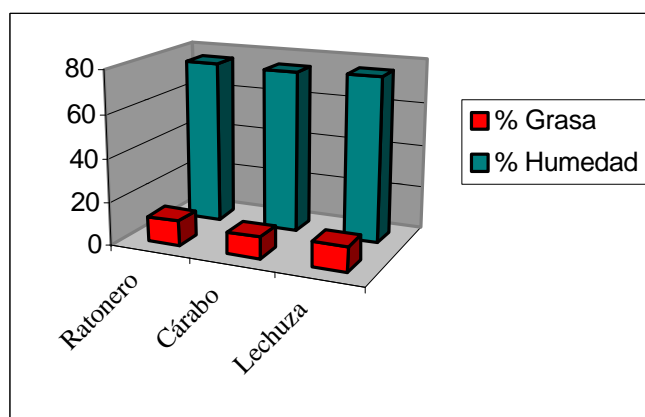


Fig. 36. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función de la especie.

En la Tabla 13 y Fig. 36, se observa que no hay diferencias significativas en % de grasa según la especie analizada, presentando valores ligeramente más altos lechuza y ratonero, sin prácticamente variación en el contenido de humedad.

Tabla 14. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del sexo.

	Hembras	Machos
nº de muestras	39	48
% Grasa	12.16	10.33
nº de muestras	108	112
% Humedad	75.23	76.29

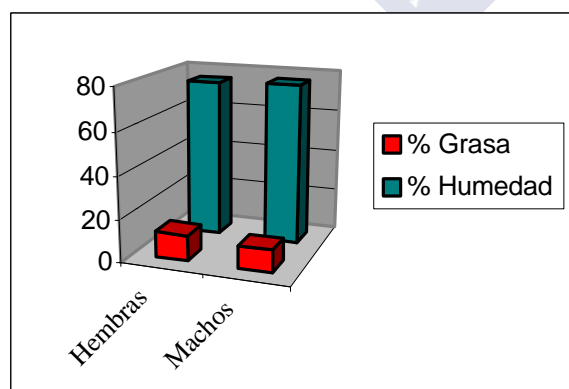


Fig. 37. Valores medios de % de humedad y % de grasa en materia seca, en función del sexo.

En la Tabla 14 y Fig. 37, los resultados muestran que contienen más % de grasa las hembras ($12.16 \pm 1.19\%$) que los machos ($10.33 \pm 0.98\%$) sin presentar diferencias significativas.

3. EXTRACCIÓN DE PAHs POR SFE

Elección del adsorbente y modificador

La técnica de extracción de fluidos supercríticos en muestras sólidas con un alto contenido en grasa, aconseja utilizar un adsorbente en fase sólida, para purificar la muestra lo máximo posible, y así evitar pasos posteriores de purificación del extracto obtenido.

Los adsorbentes más comúnmente utilizados para la extracción de PAHs por SFE son: sílica (Meyer y Kleibömer, 1993; Tena y col., 1994; Hüsters y Kleiböhmer, 1995; Hsieh y Chang, 1997), alúmina (Meyer y Kleibömer, 1993), florisil (Meyer y Kleibömer, 1993), C₁₈ (Ali y Cole, 1998), tierra de diatomeas (Porter y col., 1992; Lee y col., 1993), sulfato sódico (Bicking y col., 1993 y Dankers y col., 1993) y arena de cuarzo (Järvenpää y col., 1996). En un trabajo previo a este estudio, en el que realizamos la extracción de BaP en aromas de humo por esta técnica (Laffon y col., 1997), se obtuvieron buenas recuperaciones utilizando sílica parcialmente desactivada al 15% (2 g) o alúmina parcialmente desactivada al 10% (4 g), por lo que decidimos probar ambos adsorbentes en las mismas condiciones.

En primer lugar, en las condiciones de trabajo seleccionadas, se realizó la extracción de sílica parcialmente desactivada al 15% (2 g) y de alúmina parcialmente desactivada al 10% (4 g), inyectándolas por HPLC-FL en las condiciones de cuantificación de los diez PAHs objeto de este estudio, para conocer su respuesta. Los resultados obtenidos en ambos adsorbentes, muestran una interferencia importante coincidente con el tiempo de retención de los picos del Ant y Pir para la alúmina

parcialmente desactivada al 10%, y además para el FI en la sílica parcialmente desactivada al 15% (Fig. 38).

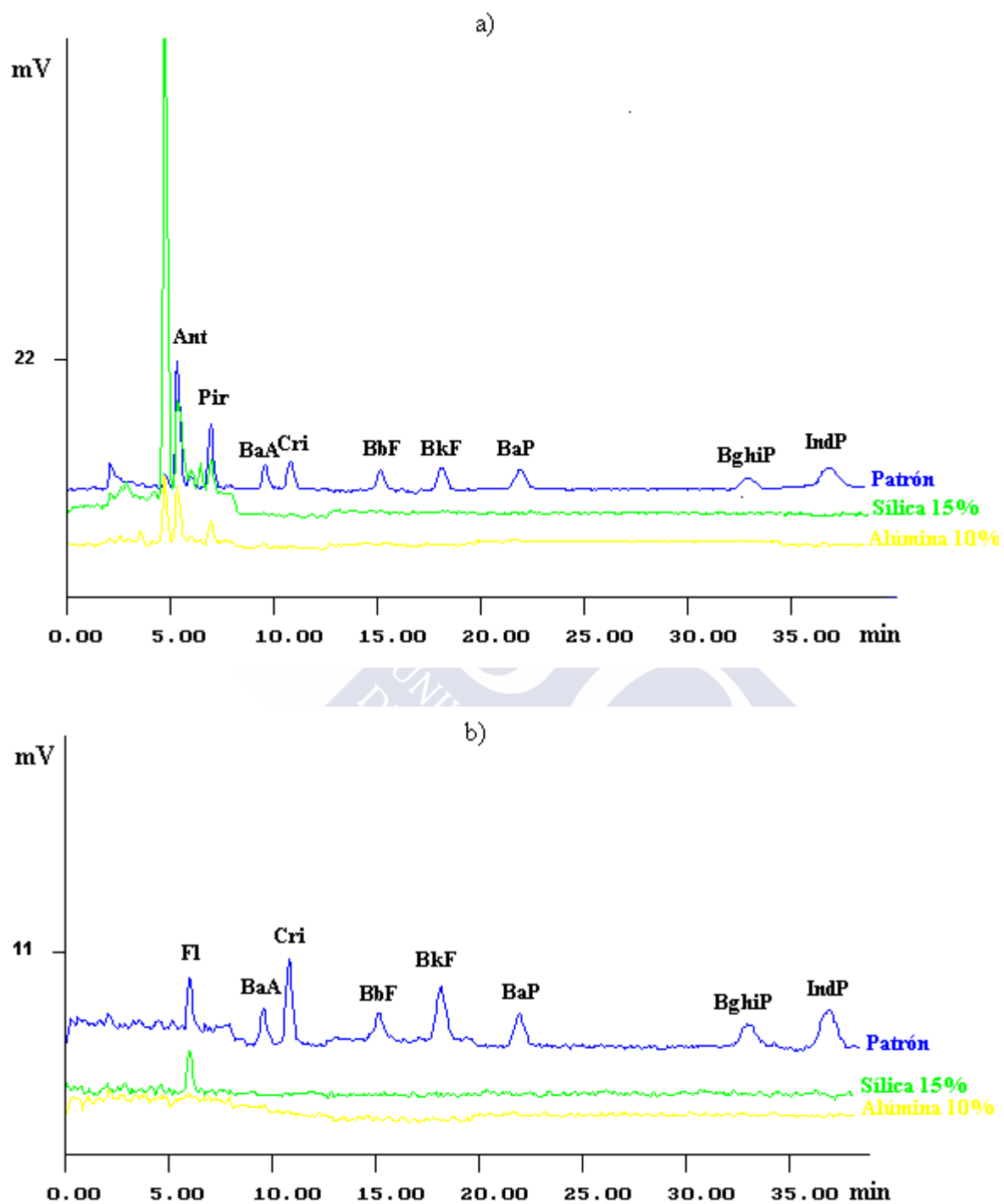


Fig. 38. Cromatogramas de HPLC de sílica al 15% y alúmina al 10% en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

Se ha procedido entonces a la purificación del adsorbente mediante su extracción en soxhlet durante seis horas, con un solvente orgánico apolar generalmente utilizado para la extracción de PAHs, el n-hexano. Los resultados obtenidos, muestran una purificación en la señal interferente con el pico del Ant en el caso de la sílica parcialmente desactivada al 15%, sin observar ninguna purificación en el caso de la alúmina parcialmente desactivada al 10%. Se procede a continuación, a la purificación con un solvente polar, el ACN. Aunque para la alúmina parcialmente desactivada al 10% no se consigue ningún tipo de purificación con dicho solvente, si para la sílica parcialmente desactivada al 15%, probándose dos tipos de ACN: MERCK (que da menos respuesta en espectrofluorimetría tras la realización de su mapa de contorno (Fig. 41)) y SCHARLAU, obteniendo menos señal con el MERCK, donde desaparece la señal interferente con el Fl, y las otras dos señales disminuyen mucho (Fig. 39). La respuesta interferente en este solvente corresponde al mismo tiempo de retención que dos PAHs estudiados: Ant y Pir. Se ha probado también la purificación de dichos adsorbentes mediante la misma técnica de SFE, inyectándolos por HPLC-FL. La respuesta que se obtiene en ambos casos, no mejora con relación a los anteriormente citados. Por ello finalmente, se ha elegido como el adsorbente más idóneo para la extracción de PAHs por SFE la sílica parcialmente desactivada al 15% previamente purificada 6 horas por Soxhlet con ACN MERCK.

El uso de modificadores (metanol, anilina, tolueno...) es recomendado por numerosos autores en la bibliografía consultada para la extracción de PAHs, incrementando la eficiencia de la extracción actuando, bien por la eliminación de los analitos desde la matriz (adición de modificadores directamente en la muestra), o incrementando la solubilidad del analito en presencia del fluido de extracción (doble sistema de bomba o fluidos mezclados) (Hawthorne y col., 1993). Uno de los más utilizados es el metanol (Hawthorne y Miller, 1987; Burford y col., 1993; Tena y col., 1994; Barnabas y col., 1995; Fernández y col., 1996; Laffon y col., 1997; Monserrate y Olesik, 1997). En nuestro caso, se han utilizado 200 μ L de metanol añadido directamente sobre la muestra previamente a la colocación del papel de filtro (Tena y col., 1994; Laffon y col., 1997).

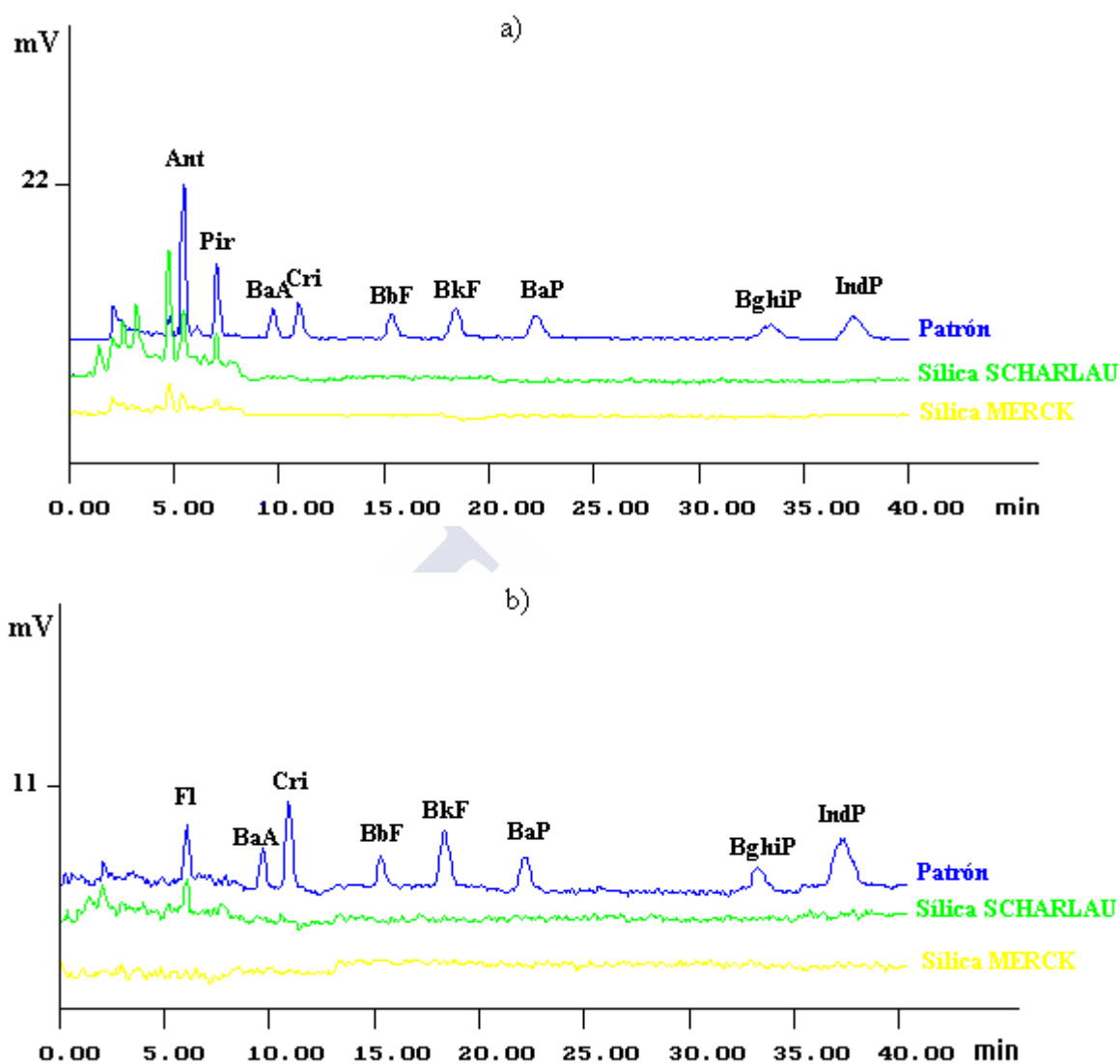


Fig. 39. Cromatogramas de HPLC de sílica al 15%, purificada seis horas por soxhlet con ACN SCHARLAU y MERCK, en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

Elección de la columna, solvente y volumen de extracción

Una vez que el fluido supercrítico ha pasado a través de la muestra es bombeado hacia la columna (trap), en donde deberán quedar retenidos los analitos (PAHs) que arrastra. En un trabajo previo a este estudio en el que realizamos la extracción de BaP en aromas de humo por esta técnica (Laffon y col., 1997), se estudiaron dos columnas:

ODS (Lee y col., 1993; Gere y col., 1993; Lee y col., 1995; Rodríguez y col., 1997; Berset y col., 1999) y SS (Hills y Hill, 1993; Miller y col., 1993; Ali y Cole, 1998), comprobando que se obtienen los mismos resultados, seleccionándose la ODS por presentar una mayor selectividad para los PAHs.

Respecto a la elección del solvente de extracción, aunque en trabajos anteriores hemos ha usado el hexano (Laffon y col., 1997), en este caso se ha elegido el ACN propuesto por diferentes autores (Tena y col., 1994), ya que es la fase móvil (polar) usada en la técnica cromatográfica de cuantificación HPLC-FL, con columna en fase reversa. La extracción con hexano nos obligaría a su evaporación a sequedad y disolución subsiguiente en ACN, y aunque ello es posible para muchos de los PAHs analizados, no lo es para el Ant, que se degrada y disminuye su concentración tras ser evaporado (Fig. 40). La elección por tanto, ha sido de un solvente polar, en este caso el ACN.

Respecto al volumen necesario de lavado, se ha utilizado el mínimo posible, no superior a 5 mL (Lee y col., 1993; Reimer y Suárez, 1995; Yang y col, 1995; Järvenpää y col., 1996; Ali y Cole, 1998). Para ello inicialmente se han utilizado 5 viales, mezclando por separado el contenido de los tres primeros viales y el de los dos últimos. Tras inyectar dichas soluciones, se ha comprobado que en el 4 y 5 vial, solo se obtiene la respuesta de señal-ruido. Posteriormente se han utilizado 3 y 4 viales respectivamente, recogiendo en este último caso sólo los tres primeros viales. Las recuperaciones obtenidas en ambos casos son similares, exceptuando para el Ant, BbF y BaP, que con tres viales sus recuperaciones disminuyen considerablemente a un 70, 78 y 85% de recuperación, respectivamente. Ello se debe a que en el proceso de llenado del SFE, el último vial de recogida lo llena después de despresurizar. Por ello, el número de viales que utilizamos es de cuatro viales con ACN, aunque despreciando el último, por tanto se obtiene un volumen de 4.5 mL, que después del lavado del primer vial con un poco de ACN, y filtrada la solución por un filtro MFS-25, se lleva a un volumen final de 5 mL de ACN, y directamente se inyecta en el cromatógrafo.

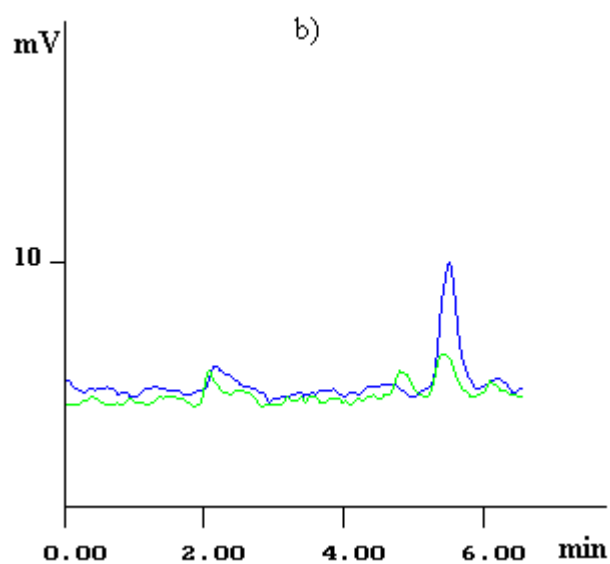
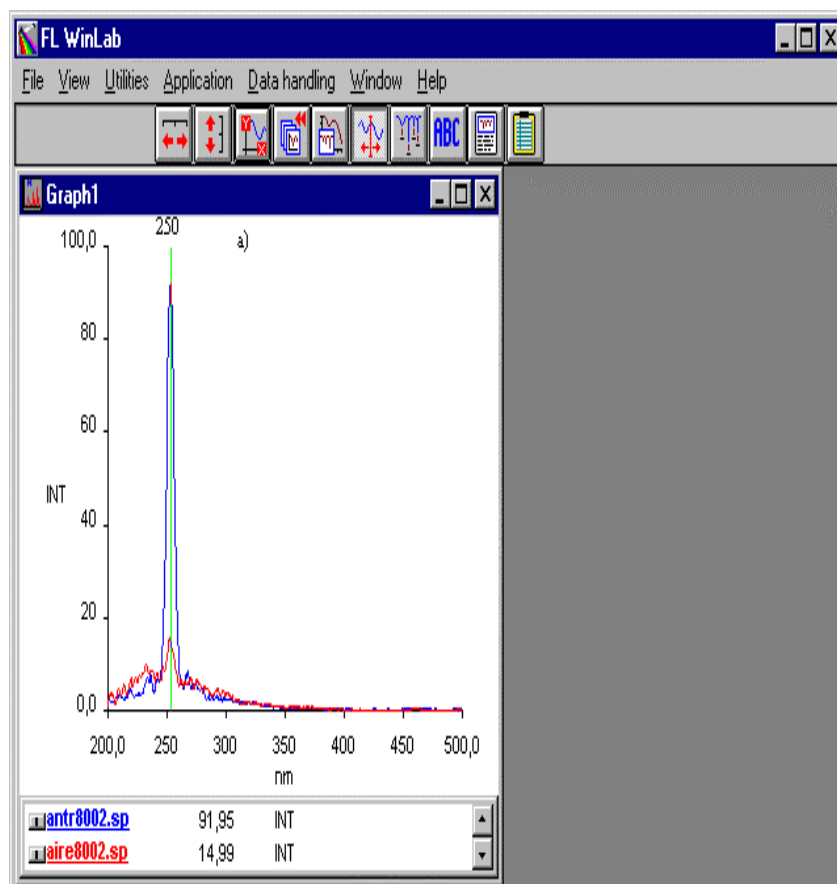


Fig. 40. Pérdida de Antraceno por evaporación a sequedad por: a) espectrofluorimetría, b) HPLC-FL.

En nuestro trabajo, la etapa de purificación habitualmente realizada mediante minicolumnas Sep Pak de Sílica, Florisil o Alúmina (Porter y col., 1992; Meyer y Kleiböhmer, 1993; Codina y col., 1994; Lee y col., 1995; Cardellicchio y col., 1996; Järvenpää y col., 1996; Laffon y col., 1997; Wenclawiak y col., 1997), es innecesaria (Hüsers y Kleiböhmer, 1995; Friedrich y Kleiböhmer, 1997; Berset y col., 1999), lo cual aporta una gran ventaja económica, rapidez de análisis, y fundamentalmente elimina pasos que pueden favorecer pérdida de las sustancias objeto de estudio frente a los otros métodos encontrados en la bibliografía, donde esta etapa de purificación es un paso inevitable.

4. ANÁLISIS

4.1. ESPECTROFLUORIMETRÍA

La técnica de espectrofluorimetría sincrónica presenta una alta sensibilidad y resolución. Es una técnica rápida, utilizada por nosotros en trabajos anteriores para la determinación de PAHs (López de Alda y col., 1995 a y b; García y col., 1996c; López de Alda y col., 1996; García y col., 1999b), que permite de forma sencilla conocer tanto la pureza de los reactivos, como seleccionar el intervalo de longitud de onda óptima para cada PAH. En este trabajo, se ha utilizado para:

1- **elección del ACN:** La elección de la pureza del solvente es fundamental en la espectrofluorimetría, ya que si éste presenta respuesta dificulta la detección de los analitos. Se han analizado diferentes ACN comerciales: MERCK, SCHARLAU, J. BAKER y CARLO ERBA, mediante la realización de 50 espectros sincrónicos en las condiciones de trabajo señaladas. Tras realizar los diagramas tridimensionales y mapas de contorno de cada uno de ellos, se ha elegido el ACN MERCK; en él se pueden observar bandas Rayleigh, en zonas extremas del espectro de fluorescencia en donde no interfieren con la señal del analito, y bandas Raman, que se presentan como pequeñas lomas de pendiente suave. El centro del diagrama, sin embargo, está formado por una amplia zona plana en donde es posible detectar y

cuantificar de manera precisa cualquier compuesto que exhiba ahí su fluorescencia (Fig. 41). Por otro lado, ACNs con un grado de pureza menor (SCHARLAU y J. BAKER), conducen a espectros no planares, con bandas Raman más acentuadas, y picos más o menos anchos de intensidad desconocida que dificultan la obtención de datos precisos (Fig. 42, mapa de contorno de SCHARLAU). De esta forma, se realiza una rigurosa selección del solvente entre las distintas casas comerciales, de una manera rápida y sencilla.

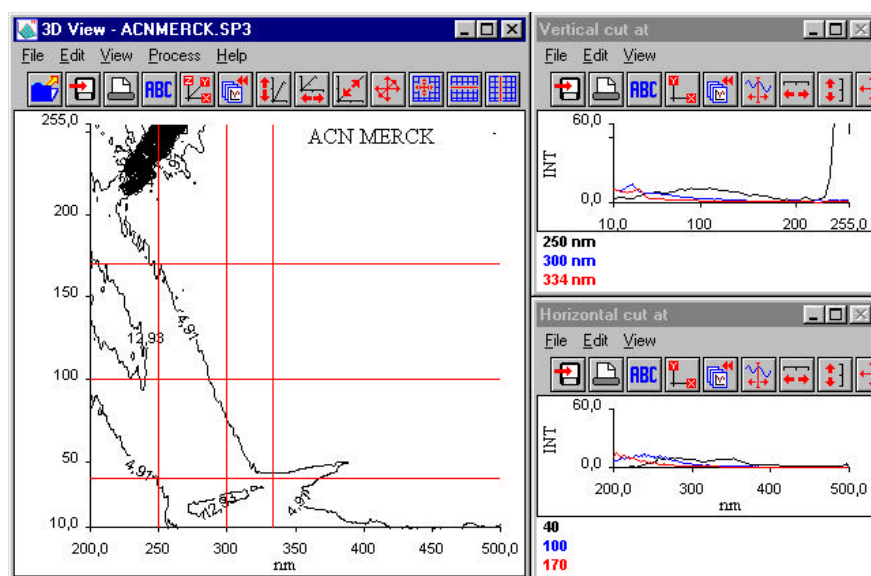


Fig. 41. Mapa de contorno de ACN MERCK y a) zoom de los espectros de emisión fijando λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.

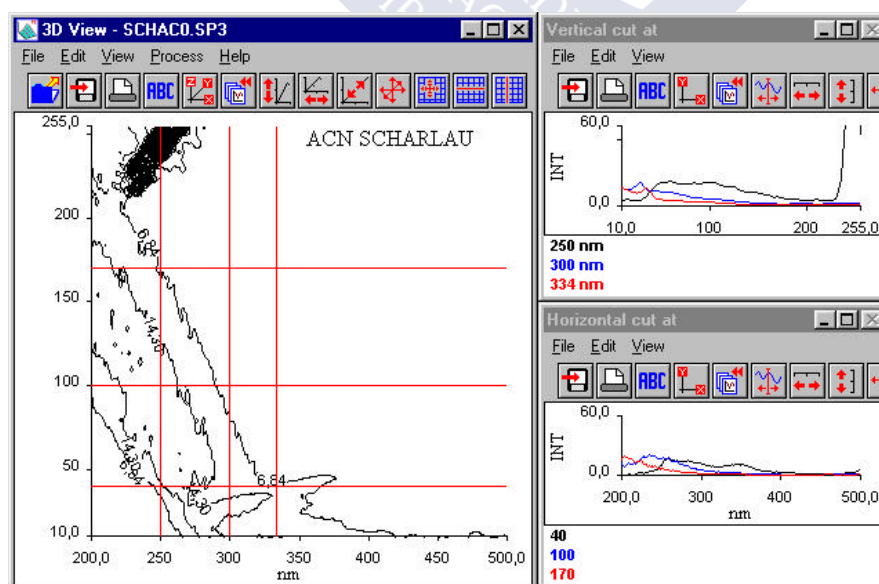


Fig. 42. Mapa de contorno de ACN SCHARLAU y a) zoom de los espectros de emisión fijando λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.

2- optimización de las longitudes de onda de los PAHs estudiados en ACN: Se realiza un barrido de 50 espectros sincrónicos de cada PAH individualmente en ACN. Tras realizar los diagramas tridimensionales y mapas de contorno, se selecciona la longitud de onda de excitación, y conocido el nº de sincron ($\Delta\lambda$) se calcula la longitud de onda de emisión (Fig. 43-52).

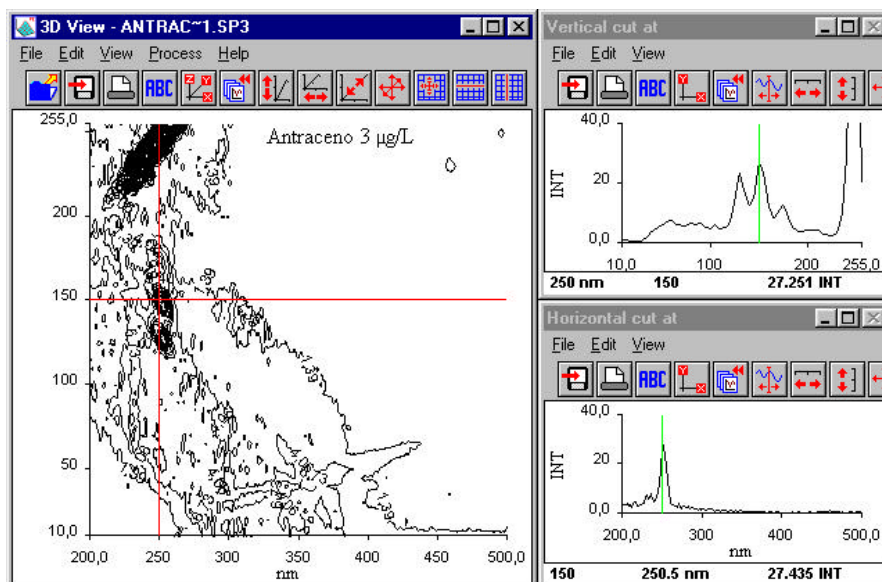


Fig. 43. Mapa de contorno del Antraceno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 250 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 150 nm.

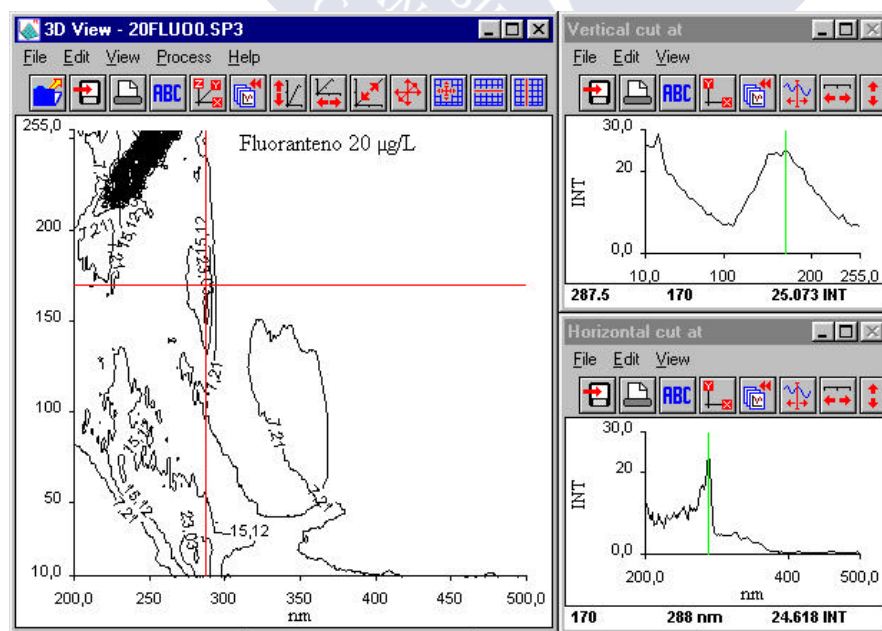


Fig. 44. Mapa de contorno del Fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 288 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 170 nm.

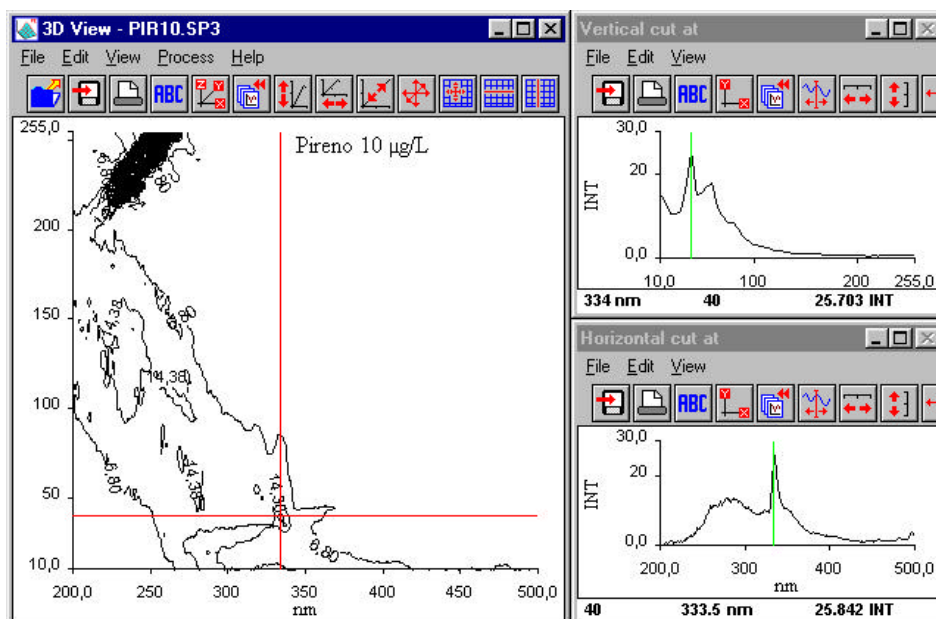


Fig. 45. Mapa de contorno del Pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 334 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40 nm.

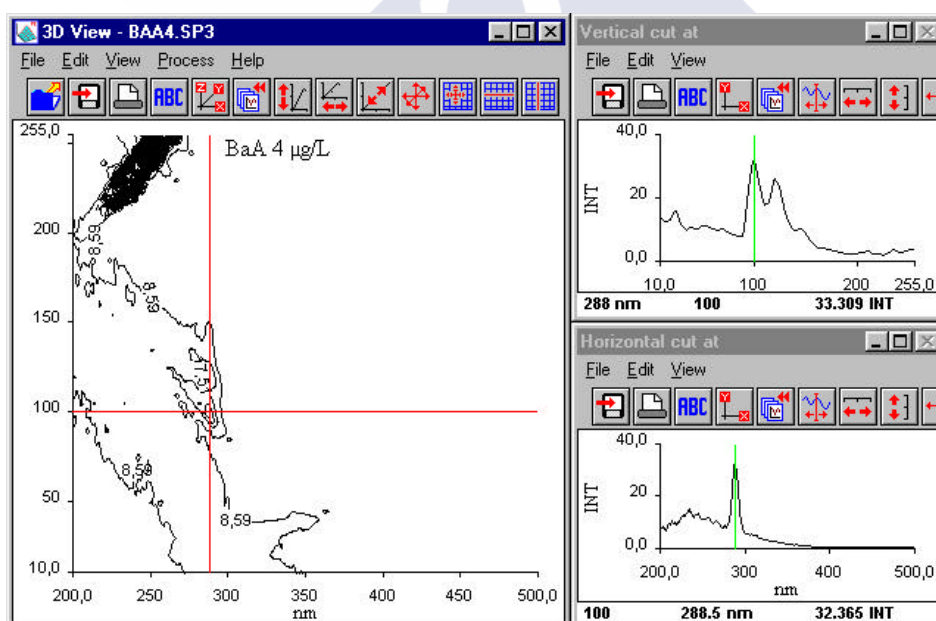


Fig. 46. Mapa de contorno del Benzo[a]antraceno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 288 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ 100 nm.

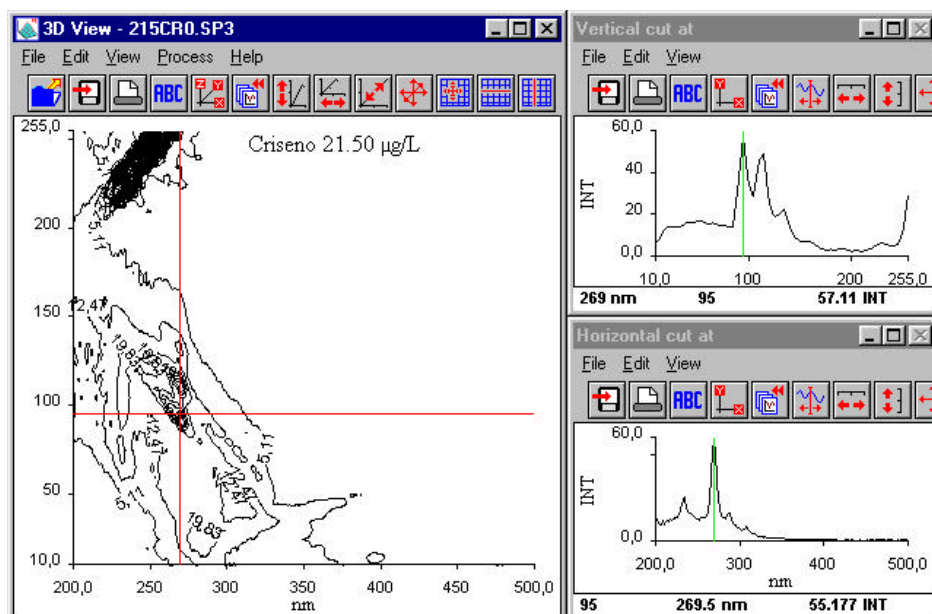


Fig. 47. Mapa de contorno del Criseno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 270 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 95 nm.

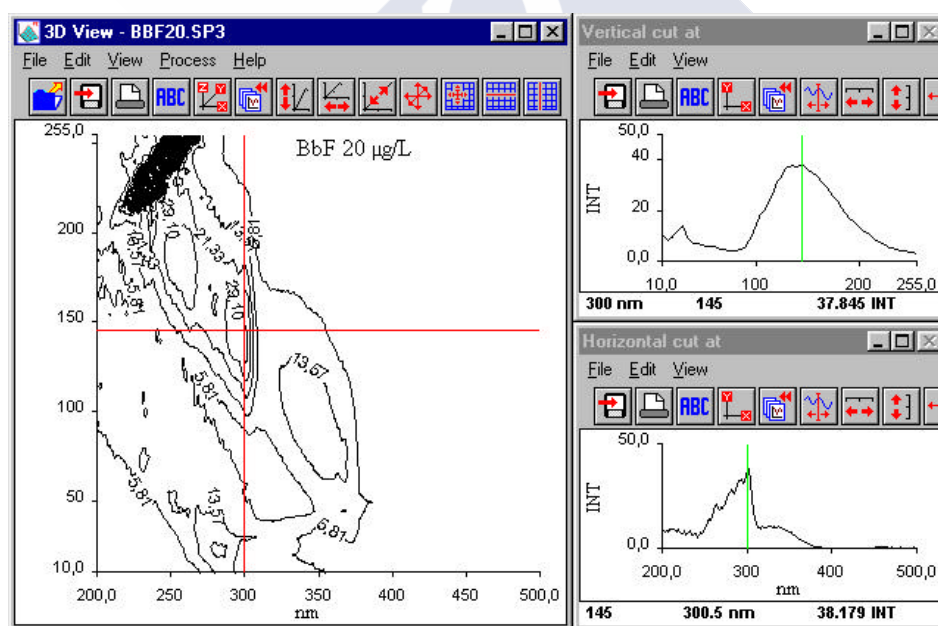


Fig. 48. Mapa de contorno del Benzo[b]fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 300 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 145 nm.

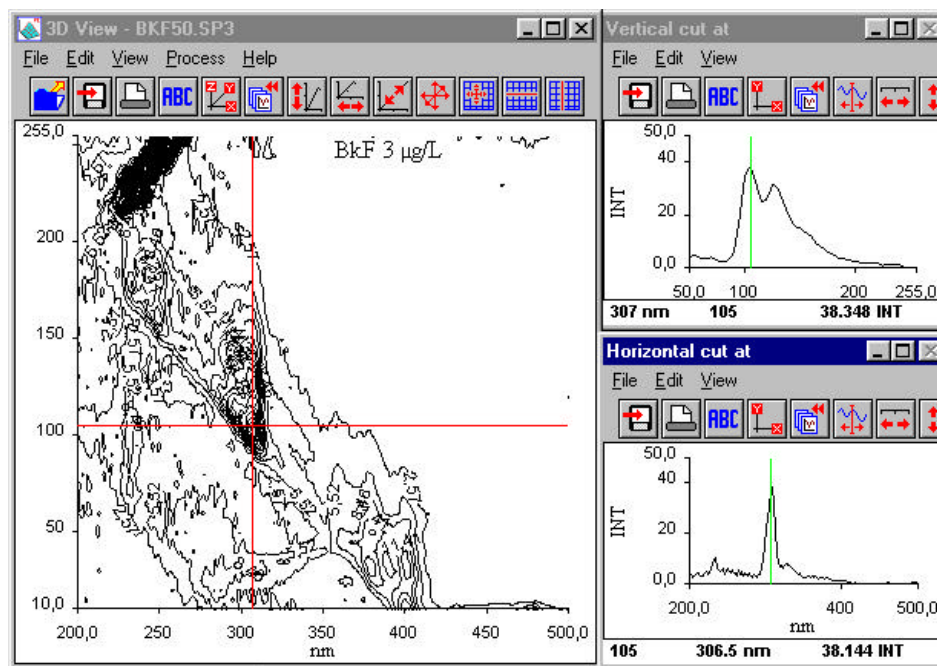


Fig. 49. Mapa de contorno del Benzo[k]fluoranteno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 307 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 105 nm.

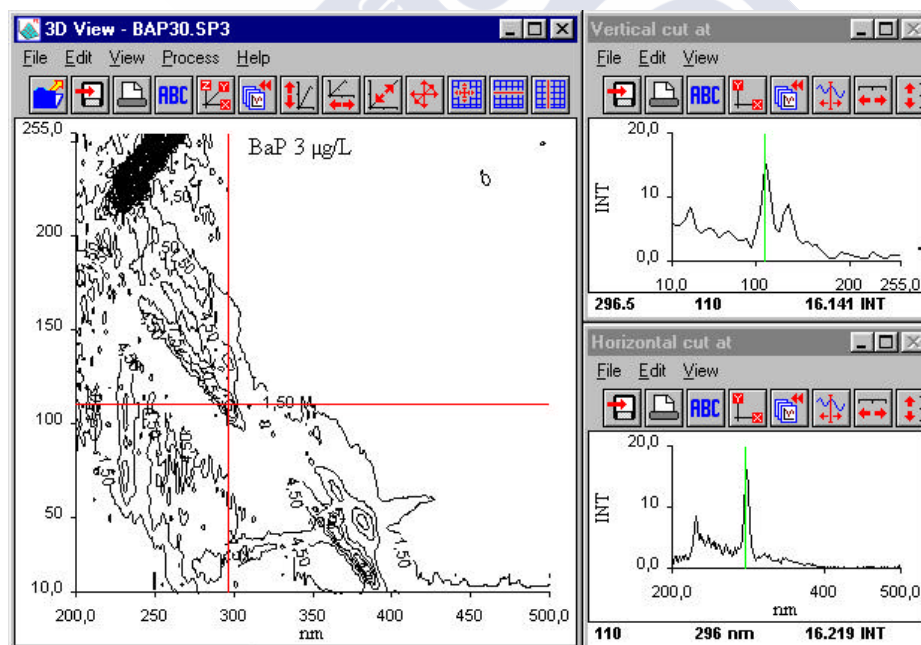


Fig. 50. Mapa de contorno del Benzo[a]pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 296 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 110 nm.

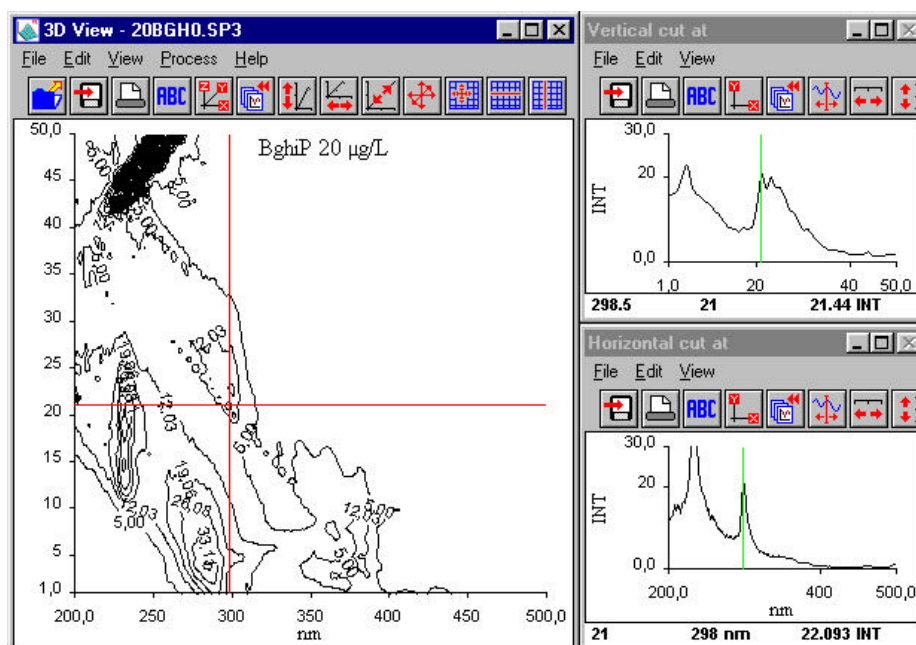


Fig. 51. Mapa de contorno del Benzo[*ghi*]perileno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 298 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 110 nm.

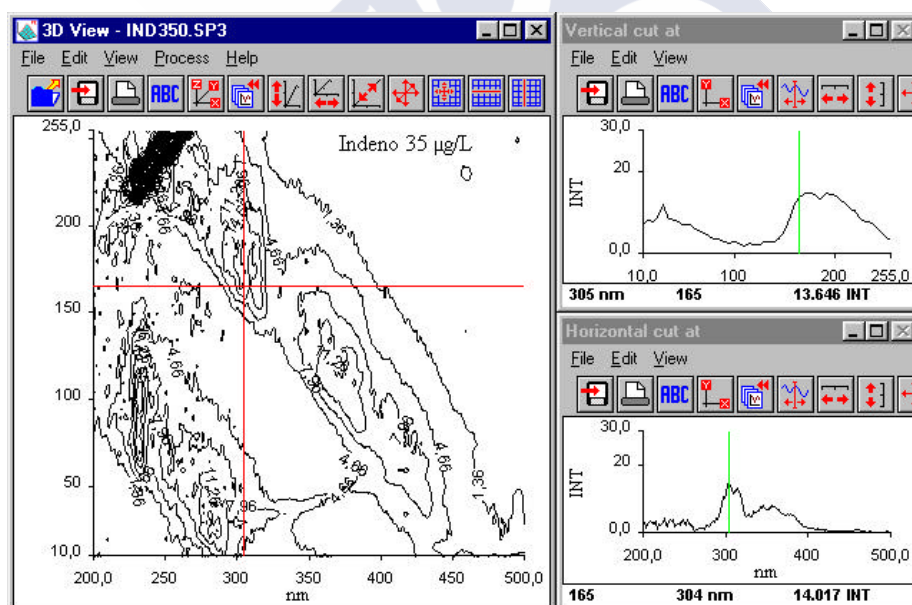


Fig. 52. Mapa de contorno del Indeno[1,2,3-*cd*]pireno en ACN, y a) zoom del espectro de emisión fijando la λ_{exc} a 305 nm, b) zoom del espectro de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 165 nm.

3- espectros de excitación y de emisión para cada PAH individualmente en ACN: Se recogen en las Fig. 53-55.

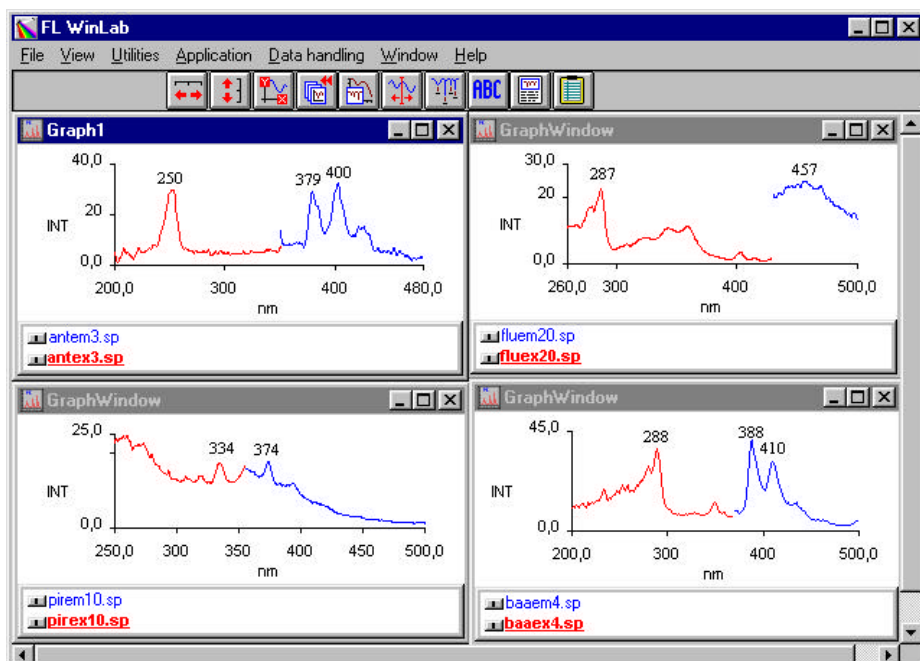


Fig. 53. Espectros de excitación y de emisión del Antraceno, Fluoranteno, Pireno y Benzo[a]antraceno en ACN.

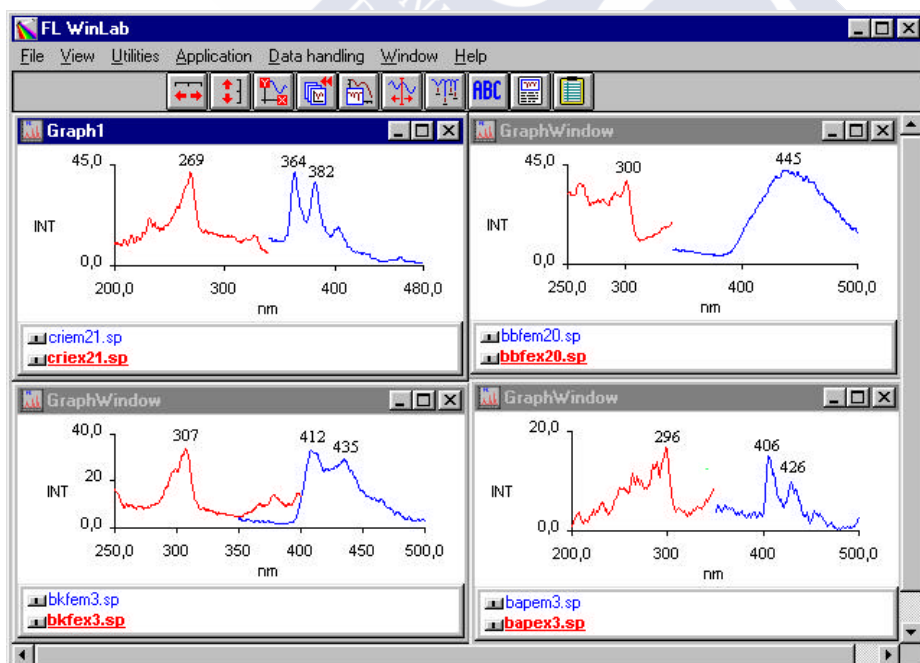


Fig. 54. Espectros de excitación y de emisión del Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno y Benzo[a]pireno en ACN.

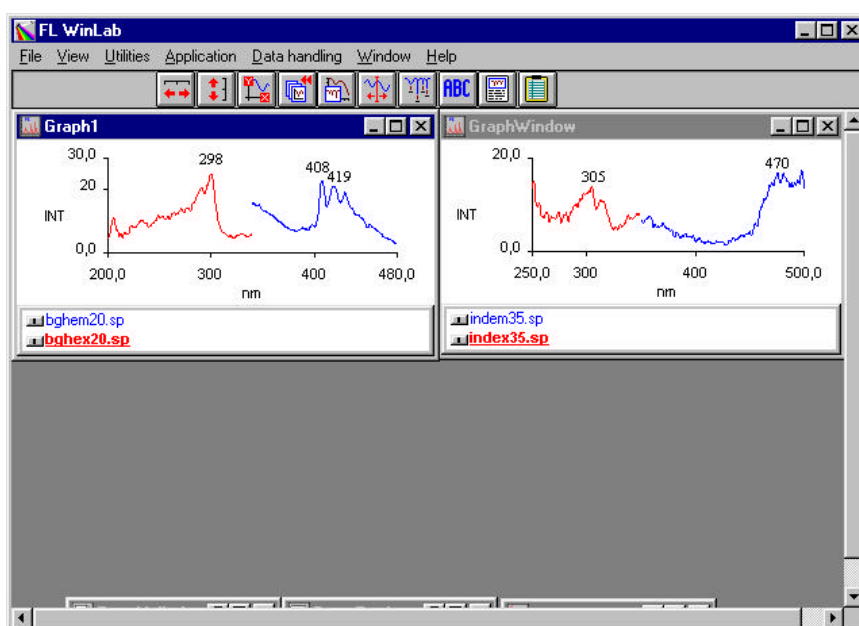


Fig. 55. Espectros de excitación y de emisión del Benzo[ghi]perileno e Indeno[1,2,3-*cd*]pireno en ACN.

4.1- el adsorbente elegido (sílica parcialmente desactivada al 15% purificado por Soxhlet durante 6 horas con ACN MERCK) extraído por SFE en las condiciones de trabajo (Fig. 56),

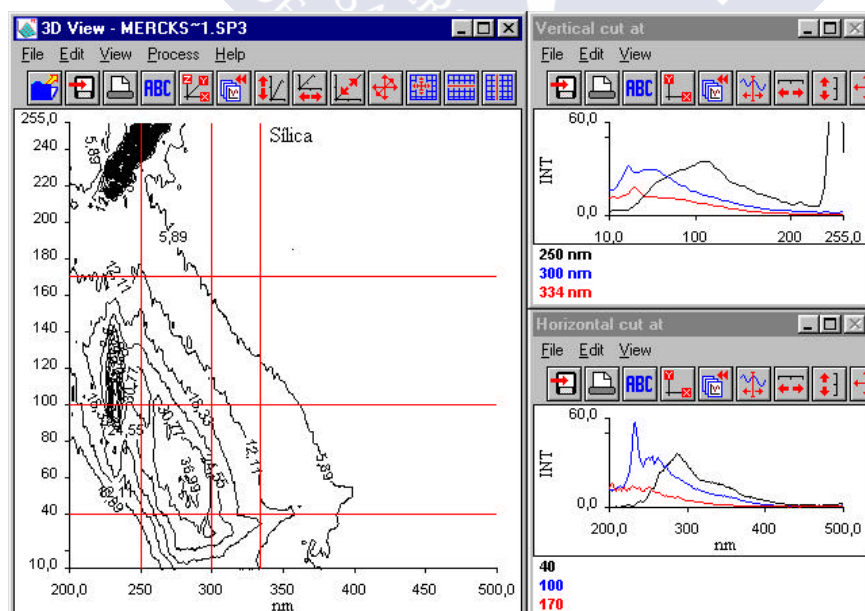


Fig. 56. Mapa de contorno de la sílica al 15% en ACN, purificada seis horas por soxhlet con ACN MERCK y a) zoom de los espectros de emisión fijando λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.

4.2- un patrón de los 10 PAHs estudiados en ACN en la concentración máxima del rango utilizado por HPLC-FL (Fig. 57),

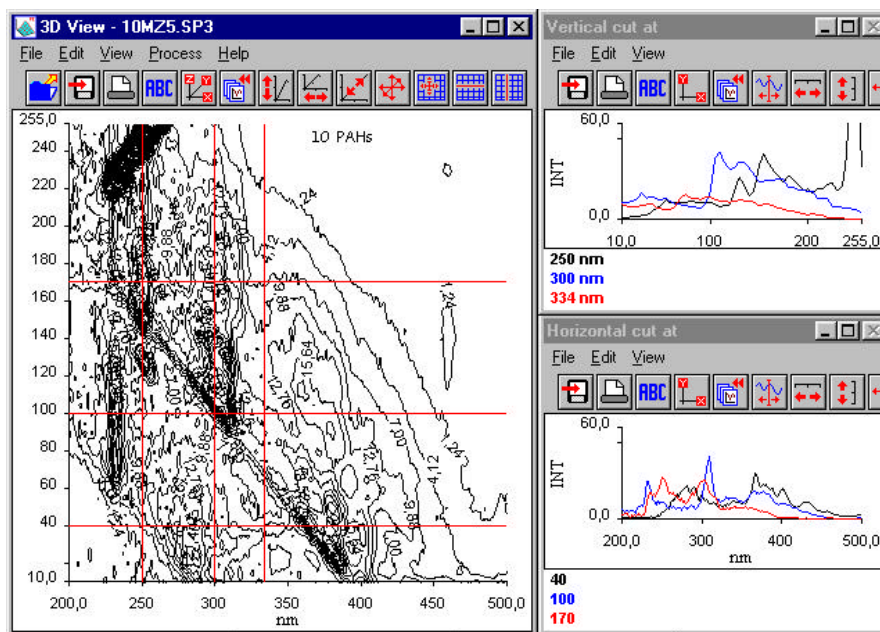


Fig. 57. Mapa de contorno de una mezcla de los diez PAHs en ACN y a) zoom de los espectros de emisión fijando λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.

4.3 de una muestra de hígado comercial de pollo (Fig. 58).

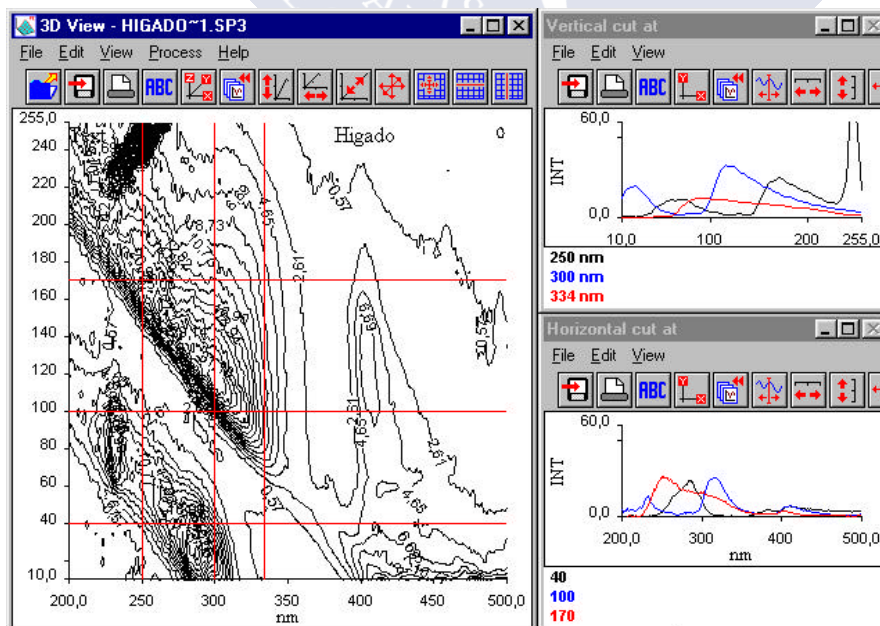


Fig. 58. Mapa de contorno de una muestra de hígado comercial de pollo en ACN y a) zoom de los espectros de emisión fijando λ_{exc} a 250, 300 y 334 nm, b) zoom de los espectros de excitación fijando $\Delta\lambda$ a 40, 100 y 170 nm.

Realizados los diagramas tridimensionales y mapas de contorno de todos ellos (Fig. 56-58), se observa la interferencia del adsorbente y de la muestra de hígado comercial de pollo, y la dificultad para resolver la mezcla de los diez PAHs estudiados, debido al parecido de las características estructurales y de fluorescencia, y además a la baja sensibilidad que presentan en ACN.

4.2. HPLC-FL

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), posee mayor resolución y sensibilidad que la espectrofluorimetría sincrónica, lo que ha permitido resolver la mezcla de los diez PAHs estudiados individualmente.

El valor del rango utilizado ha sido de 0.05, por presentar una relación señal-ruido conveniente para las concentraciones de trabajo utilizadas.

Para evitar oscilaciones en los tiempos de retención de los diez PAHs estudiados, debido fundamentalmente a las variaciones de temperatura ambiental presentes en el laboratorio, ha sido necesaria la estabilización de la temperatura de la columna (Dankers y col., 1993; Meyer y Kleibömer, 1993; Höner y col., 1995; Deuster y col., 1997; Luterman y col., 1998a), seleccionándose 32°C, ya que debe de ser una temperatura mayor a la temperatura ambiental en las diferentes estaciones: verano e invierno. El mantenimiento de la temperatura se ha conseguido haciendo recircular con un baño (Reindl y Höfler, 1994), agua a 32°C a través de un serpentín de cobre que recubre la columna (Fig. 59).

El flujo de la fase móvil ha sido 0.5 mL/min., como en trabajos anteriores realizados por nosotros en este laboratorio (Höner y col., 1995; García y col., 1996a y b; Deuster y col., 1997).

Además se han estudiado diferentes proporciones de ACN:agua en la fase móvil: 60:40, 70:30, 80:20 y 85:15, seleccionándose la de 85:15 (García y col., 1996a y b;

García y col, 1999a) por obtenerse un buen número de platos teóricos y resolverse los picos en un tiempo razonable de 40 minutos por inyección.



Fig. 59. Sistema de mantenimiento de la columna de HPLC a temperatura constante.

Cualquier modificación en alguno de estos parámetros, supone una modificación de los otros: al aumentar el flujo disminuye la eficacia, y al disminuir la proporción de ACN en la fase móvil aumenta los tiempos de retención de los diez PAHs estudiados, necesitándose tiempos de inyección de hasta 70 minutos. Al no disponer de muestreador automático, un tiempo más corto de inyección es importante, por lo que se han fijado las siguientes condiciones, para la resolución de los diez PAHs seleccionados:

Temperatura de la columna: 32°C,

Flujo: 0.5 mL/min.,

Fase móvil: ACN:agua (85:15).

Seleccionadas estas variables, se procede a estudiar la influencia del tamaño del diámetro del capilar de conexión del inyector con la precolumna y con la columna: 0.18, 0.15 y 0.13 mm, respectivamente. La mayor resolución y eficacia de los picos se obtiene con el capilar de inferior diámetro (0.13 mm), con menor volumen muerto, que con soluciones patrón no presenta problemas, pero al inyectar muestras de hígado comercial de pollo tras ser filtradas por MFS-25, se observa que se obtura con mucha facilidad, por lo que se selecciona el de diámetro de 0.15 mm, donde la resolución y eficacia de los picos son algo inferiores al anterior, pero muy superiores a las conseguidas con el capilar de 0.18 mm, y sin problemas de obturación.

Respecto al programa de las longitudes de onda utilizado para la cuantificación de los diez PAHs (Tablas 6 y 7), se observa que para algunos PAH no se han seleccionado las λ_{exc} y λ_{em} óptimas, es decir, donde se obtiene una mayor intensidad de fluorescencia (respuesta obtenida en mV). El motivo principal ha sido la proximidad en los tiempos de retención y realizar el análisis con una bomba isocrática, lo cual no permite realizar el cambio de longitudes de onda necesario para su óptima resolución. Debido a estos inconvenientes, se ha procedido a estudiar la respuesta obtenida con diferentes longitudes de onda (Perfetti y col., 1992; Ferrer y col., 1996), realizando dos inyecciones para la resolución de los diez PAHs analizados. En la primera inyección, se seleccionan las longitudes óptimas para el Ant (250-400), BaP (296-406) e IndP (304-470), utilizando para el Pir la misma que para el Ant 250-400 por su proximidad en el

tiempo de retención con el Ant y Fl, para el BaA y Cris 270-390 por la proximidad en los tiempos de retención de estos dos compuestos, para el BbF 296-426 y para el BkF 296-406. En el caso del BghiP, se han utilizado 296-426 para su cuantificación, y 296-406 para su confirmación, ya que se obtienen unos LQ más bajos, por la menor respuesta de señal-ruido obtenida en estas condiciones (Tabla 17 y 22). Debido a la proximidad de los tiempos de retención del Ant, Fl y Pir, se realiza la segunda inyección para cuantificar el Fl y BkF, y confirmar el resto de PAHs analizados.

En las tablas 15 y 16; y figuras 60-69, se recogen las características de los picos cromatográficos de cada PAH obtenidos bajo estas condiciones.

Tabla 15. Características de los picos cromatográficos según la Farmacopea Europea (EP).

PAHs	Tiempo de retención	Número de platos teóricos	Factor de asimetría
Ant	5.45	3279	1.24
Fl	6.15	3762	1.29
Pir	7.13	3372	1.07
BaA	9.83	4063	0.96
Cri	11.25	4856	1.04
BbF	17.00	8781	1.08
BkF	20.04	9007	1.03
BaP	24.33	9109	1.03
BghiP	34.87	9755	0.96
IndP	41.94	9943	0.90

Tabla 16. Características de los picos cromatográficos según la Farmacopea Americana (USP).

PAHs	Tiempo de retención	Número de platos teóricos	Factor de asimetría
Ant	5.45	3173	1.24
Fl	6.15	3798	1.29
Pir	7.13	3043	1.07
BaA	9.83	4502	0.96
Cri	11.25	4565	1.04
BbF	17.00	9383	1.08
BkF	20.04	9020	1.03
BaP	24.33	9086	1.03
BghiP	34.87	9813	0.96
IndP	41.94	10176	0.90

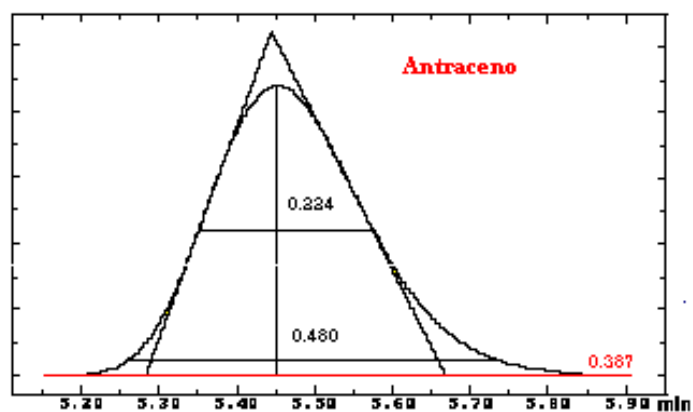


Fig. 60. Anchuras características del pico cromatográfico del Antraceno.

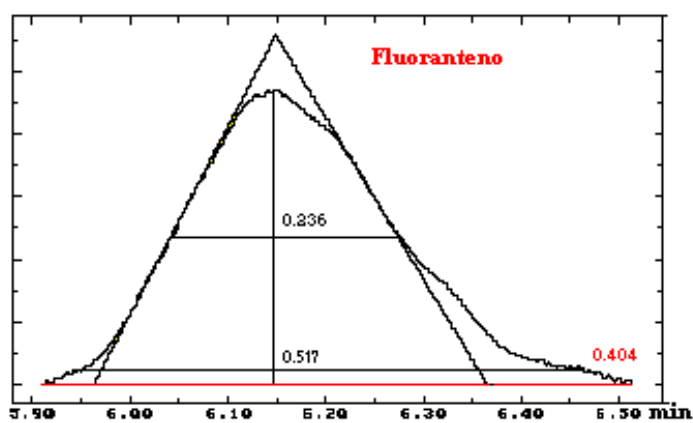


Fig. 61. Anchuras características del pico cromatográfico del Fluoranteno.

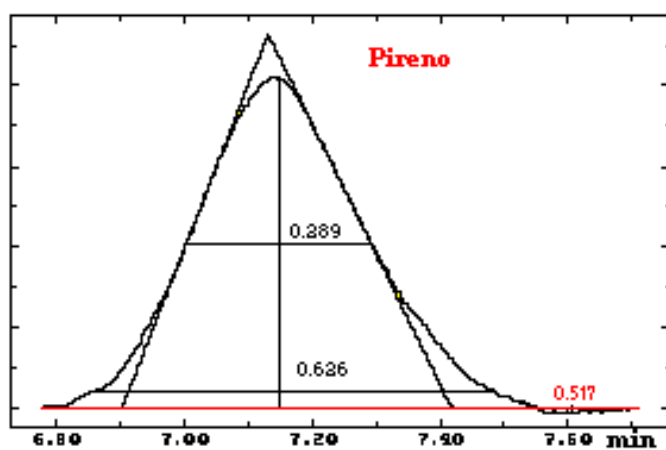


Fig. 62. Anchuras características del pico cromatográfico del Pireno.

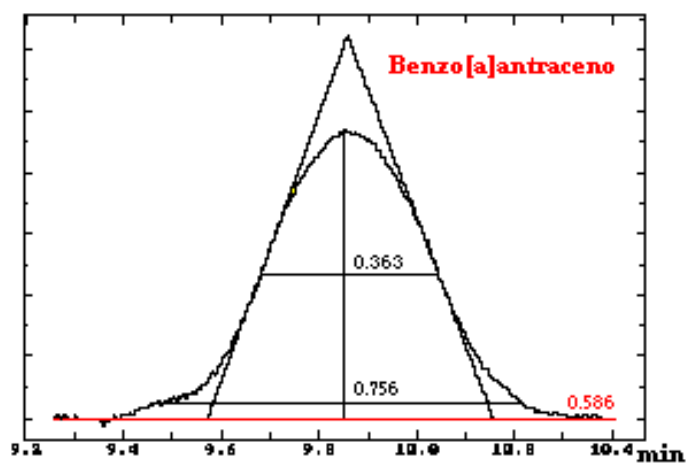


Fig. 63. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[a]antraceno.

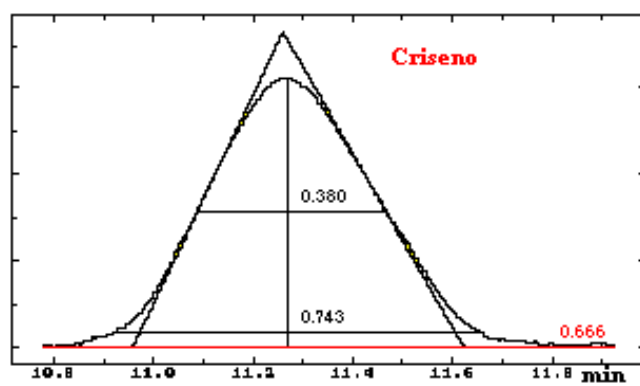


Fig. 64. Anchuras características del pico cromatográfico del Criseno.

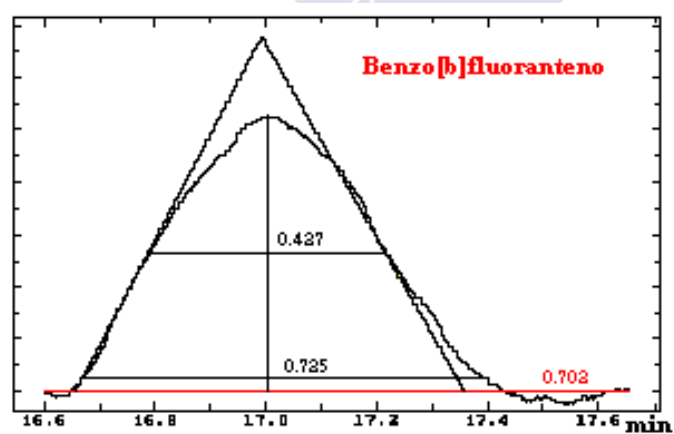


Fig. 65. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[b]fluoranteno.

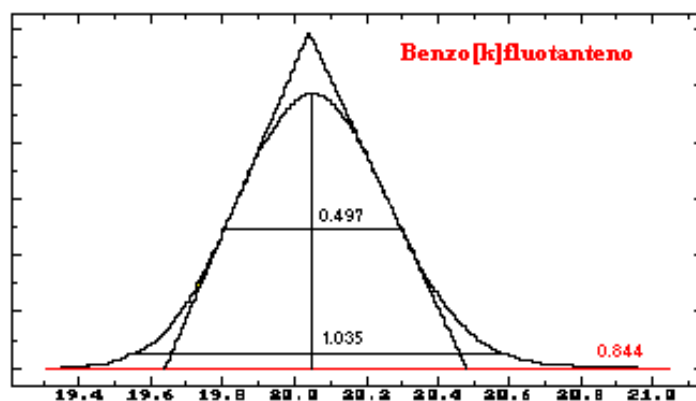


Fig. 66. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[k]fluoranteno.

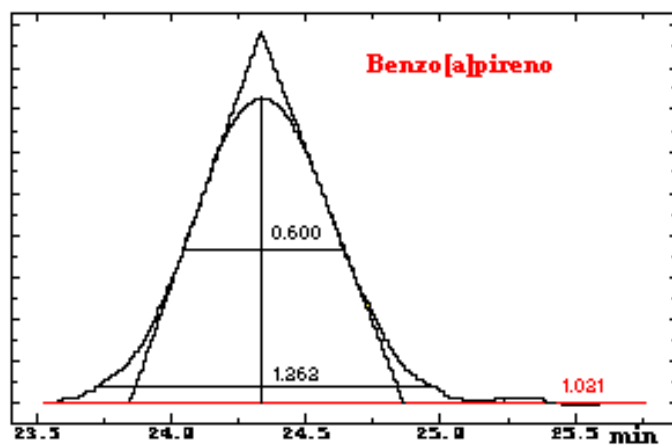


Fig. 67. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[a]pireno.

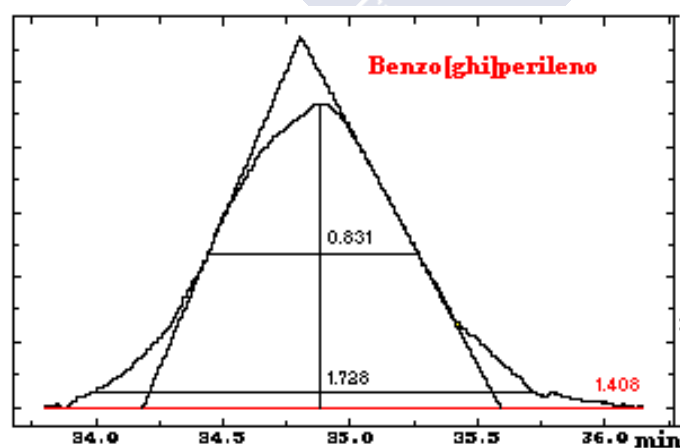


Fig. 68. Anchuras características del pico cromatográfico del Benzo[ghi]perileno.

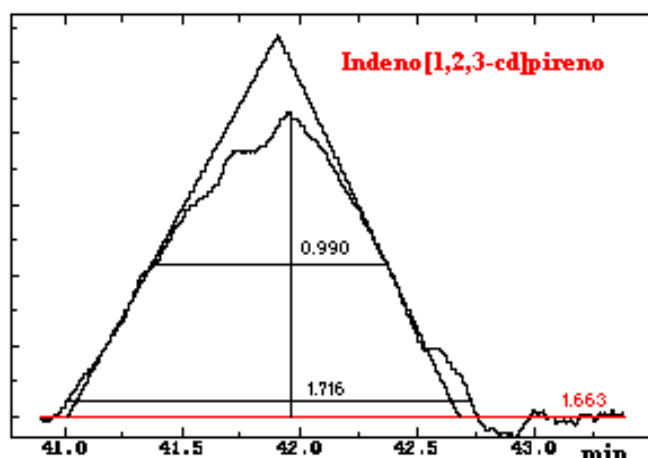


Fig. 69. Anchuras características del pico cromatográfico del Indeno [1,2,3-*cd*]pireno.

4.2.1. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación de los diez PAHs estudiados en ACN, se han calculado según las normas de la ACS (1980):

- 1) Se han hecho diez lecturas de un blanco de ACN en las condiciones cromatográficas previamente seleccionadas para cada PAH.
- 2) Se miden en mV la altura máxima y mínima de los blancos, durante el tiempo en el que se resuelve cada pico cromatográfico \pm el 10%, y se determina el valor de la altura total expresado en valor absoluto.
- 3) Con los datos obtenidos se calcula la media (\bar{X}) y la desviación estándar (SD), que nos permiten calcular el límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) en mV para cada PAH (Tabla 17).
- 4) Conocido el LQ se obtiene la recta de calibrado calculada por análisis de regresión de las concentraciones de PAHs ($\mu\text{g/L}$) medida por triplicado, frente a las alturas en mV, calculadas en las condiciones de trabajo.
- 5) Mediante las rectas de calibrado en alturas es posible calcular el LD y el LQ de los distintos PAHs en $\mu\text{g/L}$ (ACS, 1980) (Tabla 18).

Para el caso del IndP, la recta de calibrado se ha realizado en un rango de concentraciones de 16 a 35 $\mu\text{g/L}$, obteniendo un LQ de 30.6 $\mu\text{g/L}$, por lo que tres puntos

se encuentran excluidos de la recta. Al encontrar un LQ tan alto en este compuesto, debido a su escasa señal de fluorescencia, y al no ser encontrado en ninguna de las muestras analizadas, no se ha calculado la recta de regresión, y por tanto no se recoge en la Tabla.

Tabla 17. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) utilizados para la cuantificación de los diez PAHs en ACN por HPLC-FL.

PAHs	$\lambda_{exc}-\lambda_{em}$	X blanco (mV)	SD (mV)	LD (mV)	LQ (mV)	y=b+ax	r	Rango (µg/L)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Ant	250-400	1011	207	1632	3081	Altura=238.7+35590 []	0.9996	0.1, 0.5, 1, 2 y 3	0.039	0.080
Fl	286-456	687	126	1065	1947	Altura=129.4+1428 []	0.9967	1.3, 2, 3, 4 y 5	0.65	1.27
Pir	250-400	932	162	1418	2552	Altura= - 326.2+10930 []	0.9996	0.3, 0.5, 1, 2 y 3	0.16	0.26
BaA	270-390	556	70	766	1256	Altura=176.2+5394 []	0.9999	0.2, 0.5, 1, 2 y 3	0.11	0.201
Cri	270-390	627	96	915	1587	Altura=31.1+2432 []	0.9966	1, 2, 3, 4 y 5	0.36	0.64
BbF	296-426	586	106	904	1646	Altura=176.6+1465 []	0.9991	1, 2, 3, 4 y 5	0.50	1.003
BkF	296-406	588	48	732	1068	Altura=76.07+7042 []	0.9984	0.2, 0.5, 1, 2 y 3	0.093	0.14
BaP	296-406	646	52	802	1166	Altura=65.95+5494 []	0.9992	0.2, 0.5, 1, 2 y 3	0.134	0.200
BghiP	296-426	597	59	774	1187	Altura=67.9+1485 []	0.9964	1, 2, 3, 4 y 5	0.47	0.75
IndP	300-464	824	260	1605	3427				12.4	30.6

En la Tabla 17 se observa que los LD y los LQ varían mucho según el PAH analizado, mostrando la diferente sensibilidad que presentan los analitos. Los LD y LQ, expresados en unidades de concentración (µg/L), se encuentran comprendidos en un rango de 0.039-0.080 para el Ant, y de 12.4-30.6 para el IndP, respectivamente, destacando que los PAHs más sensibles son el Ant y BkF, seguidos del BaP, BaA y Pir. En término medio se encuentra el Cris, y los menos sensibles, es decir, donde se obtienen los límites más altos, son el Fl, BghiP e IndP.

Los coeficientes de correlación (r) obtenidos en todos los casos son siempre mayores a 0.996, destacando la linealidad del BaA, donde dicho coeficiente presenta el valor de 0.9999.

4.2.2. CUANTIFICACIÓN Y LINEARIDAD DE LA RESPUESTA DEL DETECTOR

Las concentraciones de los PAHs estudiados en las muestras, se determinan a partir de las rectas de calibrado obtenidas por análisis de regresión para el rango de

concentraciones de PAHs en $\mu\text{g/L}$ de ACN, medidas por triplicado, frente a las áreas de los picos (ACS, 1980) (Tabla 18, Fig. 70 y 71), exceptuando para el IndP por presentar un LQ muy alto.

Se ha comprobado que las rectas de calibrado se pueden obtener por tres procedimientos distintos, en los cuales los resultados obtenidos (coeficiente de correlación, pendiente y término independiente) como era de esperar, son exactamente iguales:

1) Introduciendo los datos obtenidos, de área frente a las concentraciones, en la calculadora en el programa LR.

2) Introduciendo los datos en el programa de fluorescencia FLDM, el cual tiene la ventaja que nos representa gráficamente la recta.

3) Haciéndolas directamente con el programa que captura los cromatogramas, el WOW, en la opción Batch Reprocessing. De esta forma se seleccionan los cromatogramas correspondientes de las rectas de regresión, en las que se identifica cada PAH a su tiempo de retención con la concentración correspondiente. Se le dan los valores por triplicado, y después se seleccionan muestras no conocidas, en las que directamente identifica los compuestos objeto de estudio, y su correspondiente concentración. Presenta la ventaja de que al seleccionar los cromatogramas de las muestras, el mismo la cuantifica, aunque para ello el cromatógrafo no puede estar capturando.

Tabla 18. Rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los PAHs estudiados.

PAHs	$\lambda_{\text{exc}}\text{-}\lambda_{\text{em}}$	$y=b+ax$	r	Rango ($\mu\text{g/L}$)
Ant	250-400	$\text{Area}=9902+1,212 \cdot 10^6 \square$	0.9993	0.1, 0.5, 1, 2 y 3
Fl	286-456	$\text{Area}=6833+52290 \square$	0.9976	1.3, 2, 3, 4 y 5
Pir	250-400	$\text{Area}= - 10580+3.979 \cdot 10^5 \square$	0.9997	0.3, 0.5, 1, 2 y 3
BaA	270-390	$\text{Area}=11520+2.308 \cdot 10^5 \square$	0.9997	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
Cri	270-390	$\text{Area}= - 2148+1.15 \cdot 10^5 \square$	0.9991	1, 2, 3, 4 y 5
BbF	296-426	$\text{Area}=3915+98000 \square$	0.9997	1, 2, 3, 4 y 5
BkF	296-406	$\text{Area}=7064+5.34 \cdot 10^5 \square$	0.9991	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BaP	296-406	$\text{Area}= - 13170+5.00 \cdot 10^5 \square$	0.9991	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BghiP	296-426	$\text{Area}= - 44300+1.883 \cdot 10^5 \square$	0.9871	1, 2, 3, 4 y 5

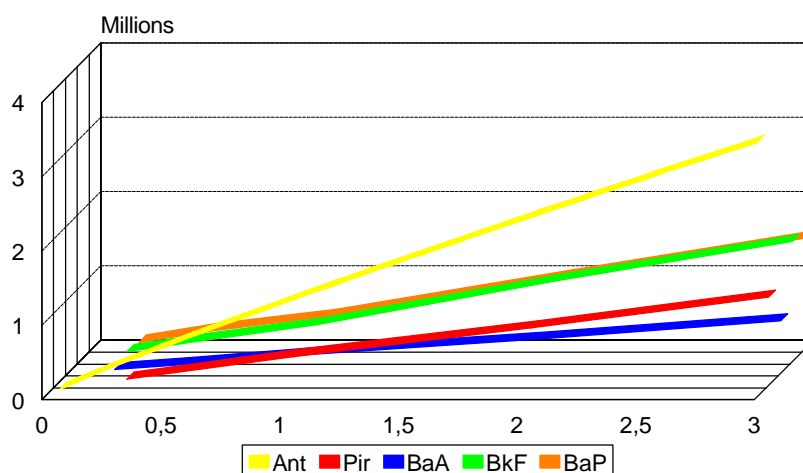


Fig. 70. Recta de calibrado del Antraceno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[k]fluoranteno y Benzo [a]pireno en ACN, obtenidas por HPLC-FL en las condiciones de cuantificación.

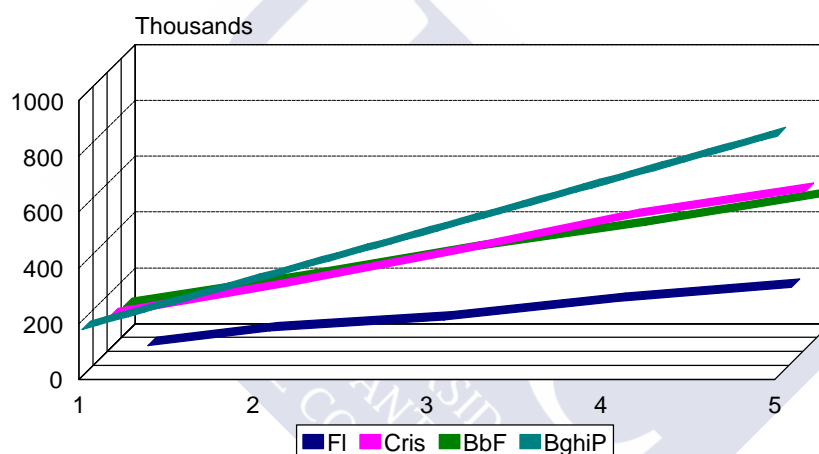


Fig. 71. Recta de calibrado del Fluoranteno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno y Benzo [ghi]perileno en ACN, obtenidas por HPLC-FL en las condiciones de cuantificación.

Como se observa en Tabla 18, todos los PAHs estudiados presentan un valor de coeficiente de correlación de 0.999, exceptuando el Fl y el BghiP, ambos con LQ más altos que el resto (Tabla17).

4.2.3. PRECISIÓN Y RECUPERACIÓN DEL MÉTODO

La precisión y recuperación del método, se ha establecido sometiendo por sixtuplicado al procedimiento experimental descrito, el adsorbente seleccionado (sílica

parcialmente desactivada al 15% purificada previamente seis horas por soxhlet con ACN MERCK) y una muestra de hígado comercial de pollo desecado, directamente y tras su sobrecarga. El procedimiento se lleva a cabo:

1º) El adsorbente se analiza por sextuplicado obteniendo una señal interferente con dos de los PAHs estudiados (Ant y Pir). Conocida la respuesta interferente, se calculan los LD y LQ de estos dos PAHs en el adsorbente (Tabla 19) (ACS, 1980). Posteriormente se procede a sobrecargar con concentraciones conocidas de los diez PAHs estudiados en dos niveles diferentes por encima de los LQ obtenidos, recogiendo los resultados en la Tabla 20.

Tabla 19. LD y LQ, del adsorbente, extraído por SFE, obtenidos por HPLC-FL ($\lambda_{\text{ex}}=250$ y $\lambda_{\text{em}}=400$), en la señal interferente con el Ant y Pir.

PAHs	X blanco (mV)	RSD% (mV)	LD (mV)	LQ (mV)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
Ant	2510	578	4243	8288	0.11	0.23
Pir	403	1780	2988	5807	0.30	0.56

Tabla 20. RSD% y %R obtenidos al someter seis veces el adsorbente sobrecargado, con los 10 PAHs, al procedimiento experimental.

PAHs	ng en adsorbente	ng añadidos	ng encontrados	RSD%	%R
Ant	0.510	1.600	1.991	4.05	94.36
	0.510	15.00	13.97	3.04	90.06
Fl	ND	7.850	7.833	4.55	99.79
	ND	25.12	20.63	3.84	82.14
Pir	1.150	3.617	4.831	5.19	101.3
	1.150	15.97	16.61	4.00	96.99
BaA	ND	1.209	1.257	7.14	103.97
	ND	15.12	14.99	1.73	99.13
Cri	ND	5.160	5.099	3.65	98.82
	ND	25.80	25.32	2.80	98.13
BbF	ND	8.000	8.466	5.30	105.8
	ND	25.44	23.91	6.52	94.00
BkF	ND	1.200	1.167	3.52	97.26
	ND	15.00	14.74	2.70	98.24
BaP	ND	1.200	1.159	2.35	96.56
	ND	15.00	13.97	2.68	93.14
BghiP	ND	5.200	5.206	2.76	100.1
	ND	16.00	15.43	1.80	96.42
IndP	ND	172.7	170.1	0.85	98.47
	ND	249.0	258.7	1.77	103.9

Las recuperaciones obtenidas en el adsorbente para los diez PAHs analizados (Tabla 20), se encuentran comprendidas entre un 82.14% para el Fl, y un 105.8% para el BbF, con $RSD\% \leq 7.14\%$.

2º) Se extraen muestras de hígado de pollo comercial desecado y pulverizado por sixtuplicado, y a continuación se sobrecarga con concentraciones conocidas de los diez PAHs estudiados en dos niveles diferentes. Los resultados analizados por sixtuplicado se recogen la Tabla 21.

Tabla 21. RSD% y %R obtenidos al someter seis veces una muestra hígado de pollo sin sobrecargar y sobrecargado, con los 10 PAHs, al procedimiento experimental.

PAHs	ng en la muestra	ng añadidos	ng encontrados	RSD%	%R
Ant	0.600	3.000	3.775	6.02	104.8
	0.600	15.00	16.21	4.92	103.9
Fl	4.710	7.850	12.97	7.05	103.3
	4.710	25.12	28.22	7.71	94.60
Pir	1.730	3.617	5.299	4.47	99.10
	1.730	15.97	17.70	4.89	100.0
BaA	ND	1.210	1.224	6.72	101.2
	ND	15.12	14.33	6.67	94.81
Cri	ND	5.160	5.232	4.87	101.4
	ND	25.80	23.93	3.77	92.75
BbF	ND	8.000	9.232	5.48	115.5
	ND	25.44	23.71	7.07	93.21
BkF	ND	1.200	1.191	1.77	99.25
	ND	15.00	14.86	2.07	99.07
BaP	ND	1.200	1.229	4.32	102.4
	ND	15.00	14.86	1.38	99.08
BghiP	ND	5.200	5.000	3.29	96.16
	ND	25.20	24.82	4.07	98.48
IndP	ND	172.7	155.5	1.45	90.02
	ND	249.0	247.6	1.39	99.46

Las recuperaciones obtenidas en el hígado de pollo para los diez PAHs analizados oscilan entre 90.02 y 115.50, para el IndP y el BbF, con $RSD\% \leq 7.71\%$.

Comparando los resultados obtenidos en las recuperaciones de los diez PAHs analizados en el adsorbente y en el hígado de pollo (Tablas 20 y 21), se observa que para casi todos los PAHs los valores del coeficiente de variación ($RSD\%$) aumentan en este último, debido a posibles interferencias desde la matriz.

Los porcentajes de recuperación y RSD% obtenidos para los diez PAHs analizados, muestran la efectividad del método propuesto, sin observar diferencias significativas en las recuperaciones de los PAHs de bajo y alto Pm, diferencia muy notable si se compara con los resultados obtenidos en la bibliografía consultada utilizando la misma técnica de extracción (Dankers y col., 1993; Lee y col., 1993; Langenfeld y col., 1994; Höner y col., 1995; Hüsters y Kleiböhmer, 1995).

4.2.4. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS

La confirmación de los resultados obtenidos en las muestras objeto de estudio, se ha realizado de las siguientes formas:

1) Por **HPLC-FL**, en idénticas condiciones de trabajo, pero cambiando las longitudes de onda de excitación y de emisión.

En estas nuevas condiciones, la respuesta de algunos PAHs (Ant, Fl y Pir) desaparece. El IndP no responde a ninguna longitud de onda diferente a la de cuantificación, y los otros seis PAHs presentan una intensidad menor que con las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación.

Los LD y LQ encontrados con estas longitudes de onda se han calculado de la misma forma que anteriormente se cita (ACS, 1980), aunque el rango utilizado no ha sido el mismo en todos los casos, puesto que en estas condiciones la sensibilidad disminuye. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 22.

Tabla 22. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) utilizados para la confirmación de seis PAHs en ACN por HPLC-FL.

PAHs	$\lambda_{exc}-\lambda_{em}$	X blanco (mV)	SD (mV)	LD (mV)	LQ (mV)	y=b+ax	r	Rango ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
BaA	266-380	602	145	1037	2052	Altura=5.712+3569 []	0.9964	0.5, 1, 2 y 3	0.29	0.57
Cri	266-380	686	224	1358	2926	Altura= - 92.60+3419 []	0.999	1, 2, 3, 4 y 5	0.42	0.88
BbF	296-406	661	153	1120	2191	Altura=91.20+862.8 []	0.9998	2, 3, 4 y 5	1.19	2.43
BkF	296-426	631	103	940	1661	Altura= 178.6+7108 []	0.9990	0.2, 0.5, 1, 2 y 3	0.1071	0.208
BaP	296-426	746	199	1343	2736	Altura= -482.7+4079.5 []	0.9995	1, 2 y 3	0.45	0.79
BghiP	296-406	1033	172	1549	2753	Altura= 155.1+1480.4 []	0.9964	2, 3, 4 y 5	0.94	1.75

Las rectas de regresión, en áreas, correspondientes para los seis PAHs, en estas condiciones se encuentran recogidas en la Tabla 23.

Tabla 23. Rectas de calibrado utilizadas para la confirmación de seis PAHs

PAHs	$\lambda_{exc}-\lambda_{em}$	$y=b+ax$	r	Rango ($\mu\text{g/L}$)
BaA	266-380	Area= - 18121+164820 []	0.9993	0.5, 1, 2 y 3
Cri	266-380	Area= - 4762+1.643 10^5 []	0.9971	1, 2, 3, 4 y 5
BbF	296-406	Area= - 1680+60386 []	0.9903	2, 3, 4 y 5
BkF	296-426	Area= 17410+5.34 10^5 []	0.9996	0.2, 0.5, 1, 2 y 3
BaP	296-426	Area= - 27829+356513 []	0.9993	1, 2 y 3
BghiP	296-406	Area= - 39424+202352 []	0.9976	2, 3, 4 y 5

2) **Relación de áreas:** la relación de áreas obtenidas en las condiciones de cuantificación y en las de confirmación, es constante e independiente de la concentración del PAH estudiado (Fig. 72)

La respuesta del adsorbente en las condiciones de confirmación, desaparece en los tiempos de retención coincidentes con el Ant y Pir, sin embargo, se ha podido utilizar para la confirmación del BaA (Fig. 39).

3) Mediante la realización de **espectros en modo sincron** sin para el barrido (García y col., 1996 a y b)

Una vez realizados los espectros en modo sincron en las condiciones de trabajo citadas en la parte experimental, éstos quedan almacenados momentáneamente en el detector de fluorescencia hasta la próxima inyección, debiendo ser recuperados como archivo con extensión "raw" mediante la opción "replay". La velocidad con la que el detector envía al integrador estos espectros, puede ser controlada, fijándose en 40 nm/seg.

Estos archivos son visualizados mediante el software WOW como un cromatograma convencional, es decir, en el eje de las abscisas los tiempos de retención en segundos y en las ordenadas la intensidad en mV. Mediante el cursor se determina el tiempo al que sale el máximo de intensidad, y conocido el rango espectral (100 nm) y la velocidad de envío (40 nm/seg.) se puede calcular la longitud de onda de excitación correspondiente a dicho máximo.

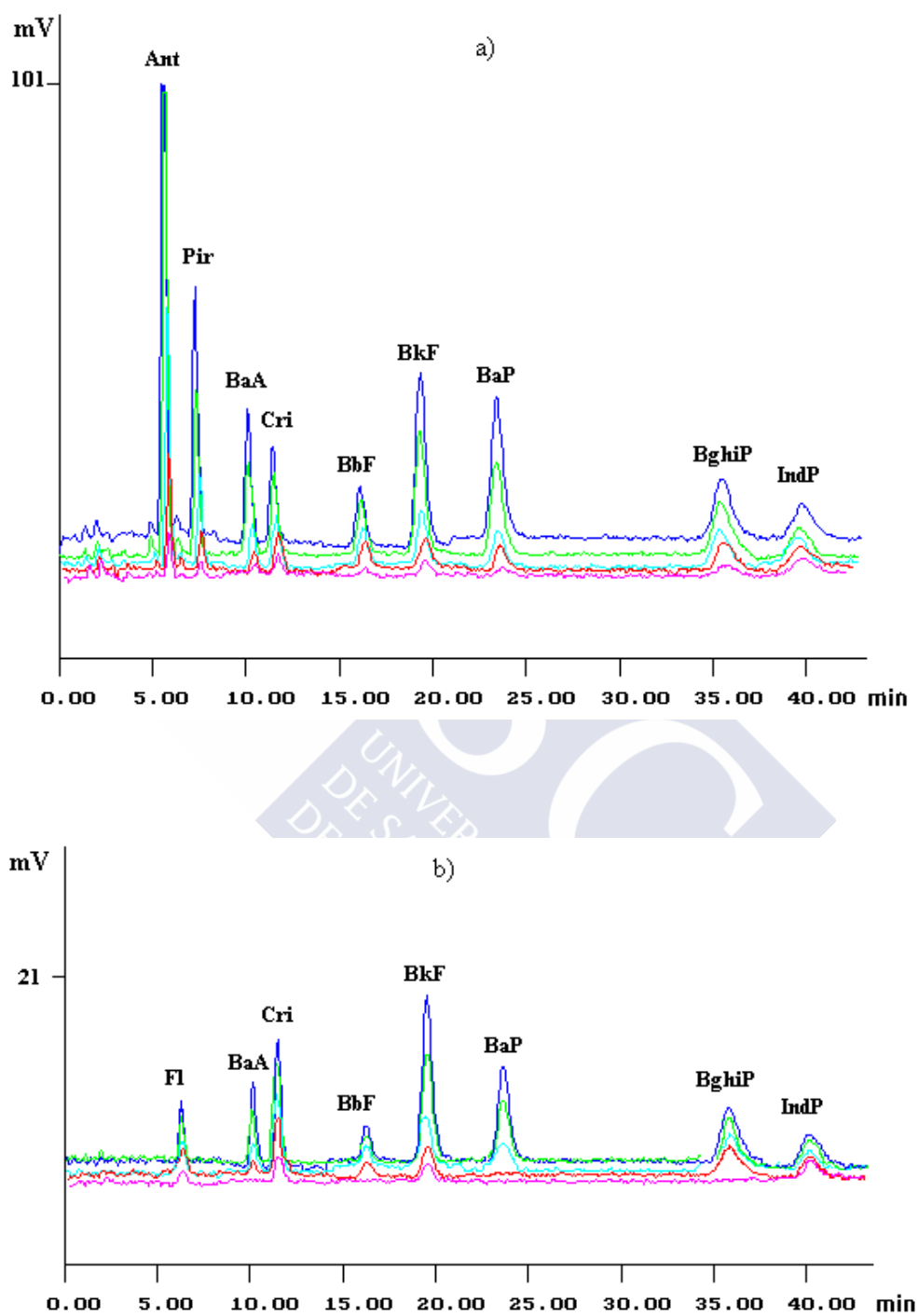


Fig. 72. Cromatograma de HPLC de patrón de los diez PAHs en ACN en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

Posteriormente se han manipulado dichos espectros mediante el software PAINTHBRUSH para transformar el eje de las abscisas en unidades de longitud de onda (nm).

Para que la confirmación de resultados mediante esta técnica sea totalmente fiable, se necesitan concentraciones mínimas del orden de 0.4 $\mu\text{g/L}$ de Ant, 3 $\mu\text{g/L}$ de Fl, 0.5 $\mu\text{g/L}$ de Pir y BaP; 1 $\mu\text{g/L}$ de BaA y BkF; 2 $\mu\text{g/L}$ de BghiP y Cri y 30 $\mu\text{g/L}$ de IndP; ya que cantidades más bajas no son detectables (Fig. 73-82).

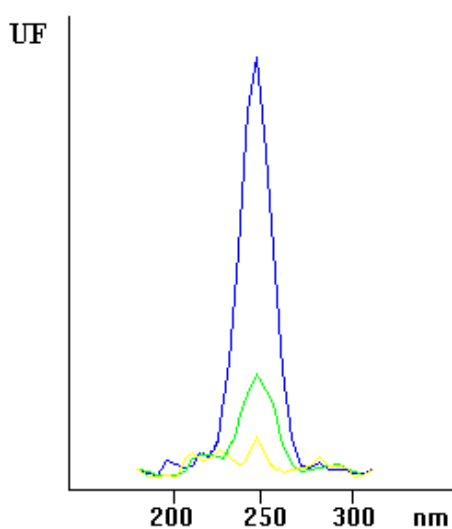


Fig. 73. Espectros sincrónicos del Antraceno en ACN (0.4, 1 y 3 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL.

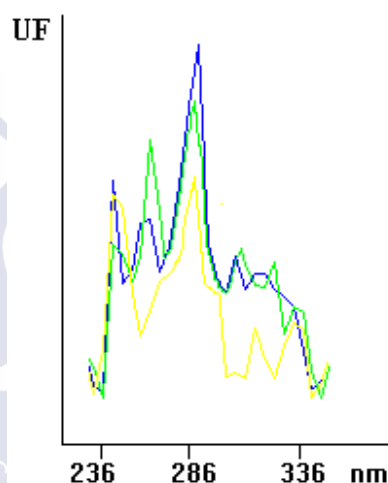


Fig. 74. Espectros sincrónicos del Fluoranteno en ACN (3, 4 y 5 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL.

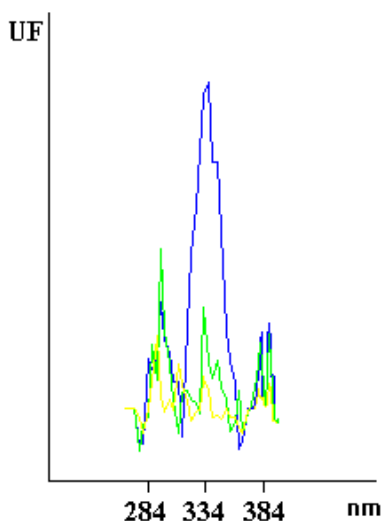


Fig. 75. Espectros sincrónicos del Pireno en ACN (0.5, 1 y 3 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL.

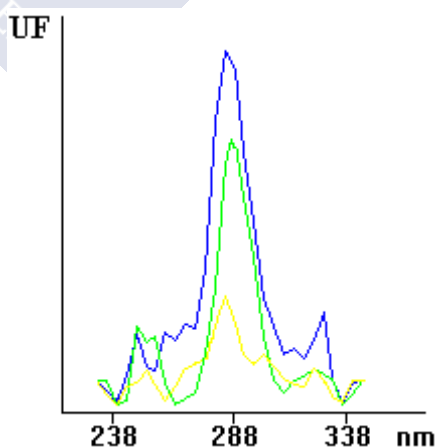


Fig. 76. Espectros sincrónicos del Benzo[a]antraceno en ACN (1, 3 y 5 $\mu\text{g/L}$) realizados mediante HPLC-FL.

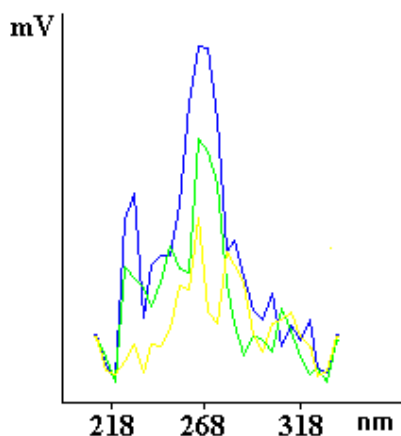


Fig. 77. Espectros sincrónicos del Criseno en ACN (2, 3 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

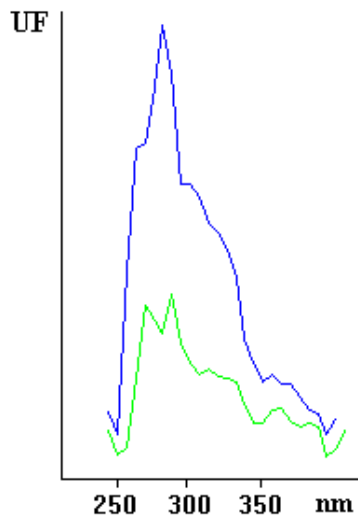


Fig. 78. Espectros sincrónicos del Benzo[b]fluoranteno en ACN (5 y 20 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

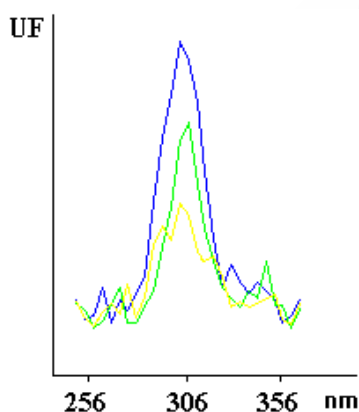


Fig. 79. Espectros sincrónicos del Benzo[k]fluoranteno en ACN (1, 2 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

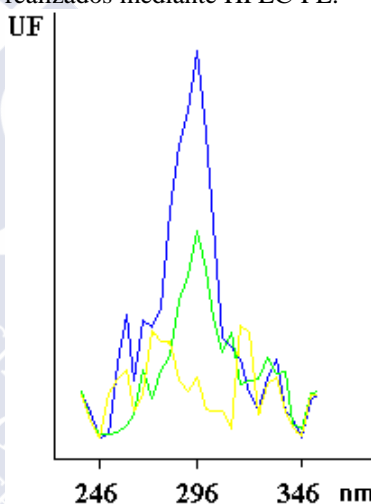


Fig. 80. Espectros sincrónicos del Benzo[a]pireno en ACN (0.5, 1 y 3 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

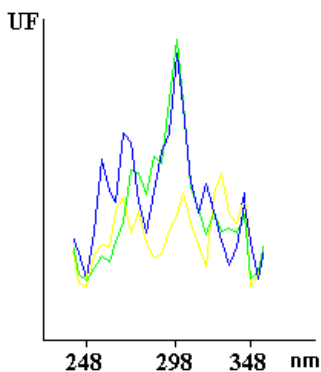


Fig. 81. Espectros sincrónicos del Benzo[ghi]perileno en ACN (2, 3 y 5 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

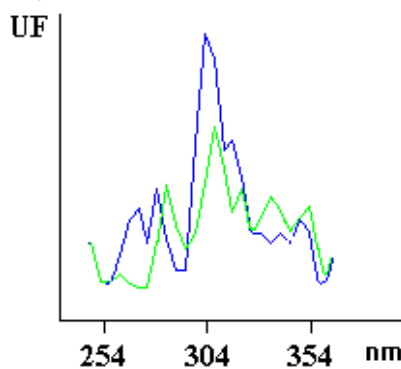


Fig. 82. Espectros sincrónicos del Indeno [1,2,3-cd]pireno en ACN (30 y 35 µg/L) realizados mediante HPLC-FL.

Por ello, los ensayos de confirmación han sido realizados en las muestras que se han encontrado los niveles de polución cuantificables, concentrando unas diez veces el volumen final del extracto extraído. Para tener la completa seguridad en la identificación de los PAHs con los que la sílica parcialmente desactivada al 15% presenta interferencias (Ant y Pir), previamente ha sido necesario realizar la confirmación, en modo sincron, del adsorbente sólo y sobrecargado con estos dos PAHs (Fig. 83 y 84).

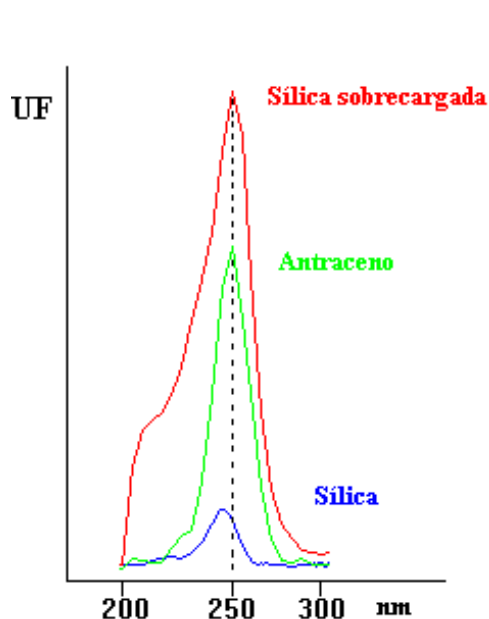


Fig. 83. Espectros sincrónicos del Antraceno, sílica y sílica sobrecargada con Antraceno en ACN realizados mediante HPLC-FL.

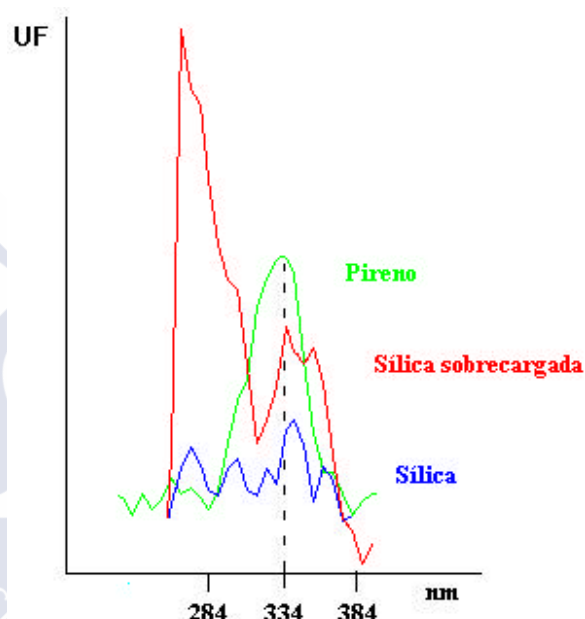


Fig. 84. Espectros sincrónicos del Pireno, sílica y sílica sobrecargada con Pireno en ACN realizados mediante HPLC-FL.

Los resultados obtenidos, muestran que la respuesta del adsorbente no coincide en el máximo del pico obtenido para ambos PAHs, mientras que cuando el adsorbente está sobrecargado con alguno de los analitos, el máximo coincide exactamente. Por lo tanto, se puede afirmar que la confirmación realizada en las muestras, no conduce a error. En las Fig. 85-88, se muestra un espectro sincron de Ant, Fl, Pir, BaA en muestras, observándose la diferencia entre las que se confirma su presencia y aquellas otras en las que se observa un desplazamiento del máximo, indicando que no son los PAHs analizados.

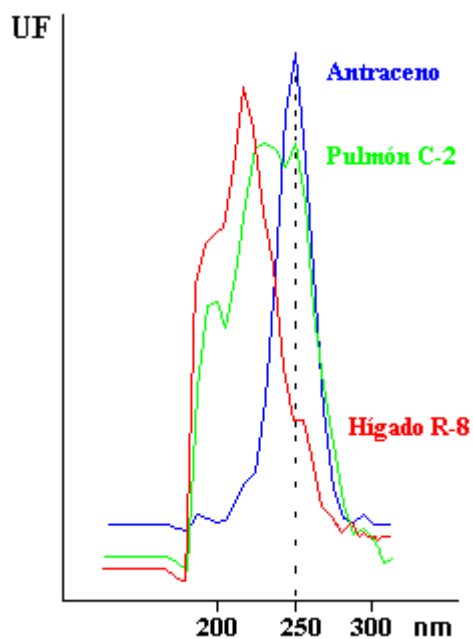


Fig. 85. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Antraceno y Antraceno en el pulmón de la muestra C-2 y en el hígado de la muestra R-8 realizados mediante HPLC-FL.

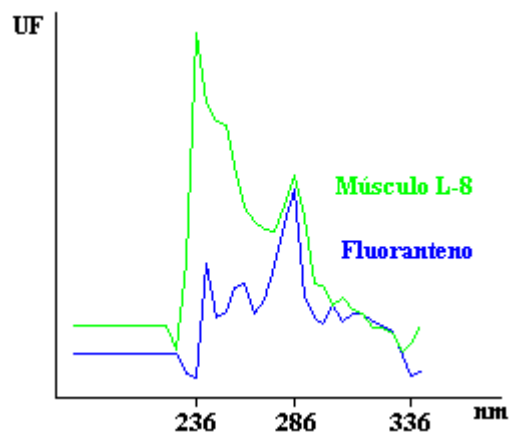


Fig. 86. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Fluoranteno y Fluoranteno en el músculo de la muestra L-8 realizados mediante HPLC-FL.

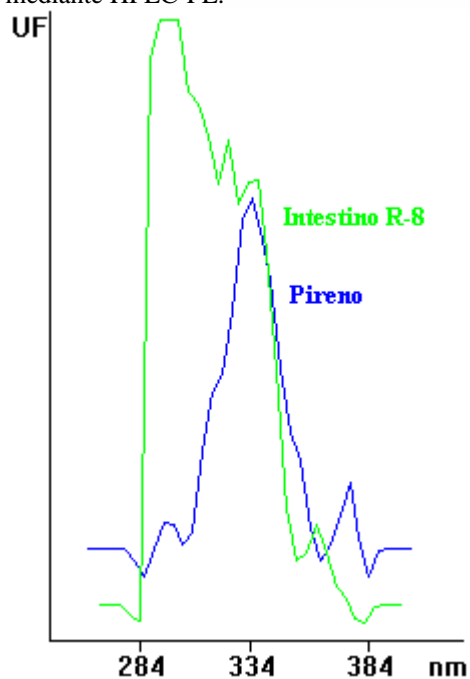


Fig. 87. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Pireno y Pireno en el intestino de la muestra R-8 realizados mediante HPLC-FL.

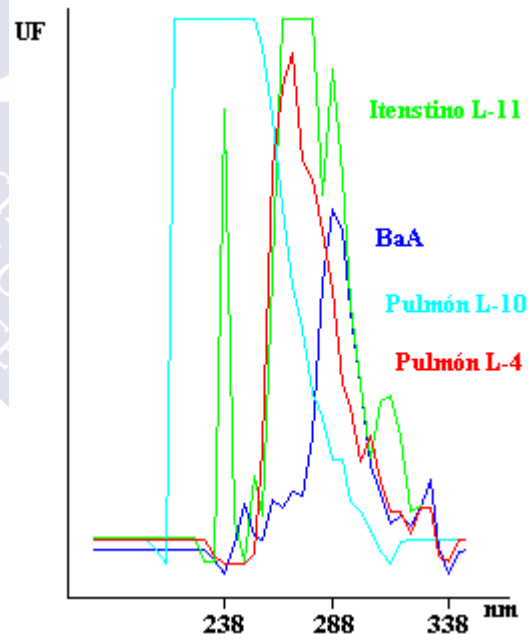


Fig. 88. Espectros sincrónicos en ACN de patrón de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]antraceno en el intestino de la muestra L-11 y en el pulmón de las muestras L-10 y L-4, realizados mediante HPLC-FL.

4) **Degradación de PAHs por radiación ultravioleta a 254 nm** durante 16 horas: Aunque en un principio se pensó que la radiación UV a 254 nm se podría utilizar para confirmar la presencia de los PAHs en las muestras analizadas, sin embargo, no ha sido posible por los siguientes motivos:

a) Sólo de los 10 PAHs estudiados, dos de ellos sufren un alto porcentaje de degradación: el Ant un 86.66 ± 1.30 % y el BaP un 86.11 ± 2.72 % (este sólo se ha encontrado en una muestra, y no en una gran concentración) (Fig. 89).

b) El adsorbente vuelve a coincidir en su respuesta con el Ant, su señal también desaparece e impide el uso de este método de confirmación.

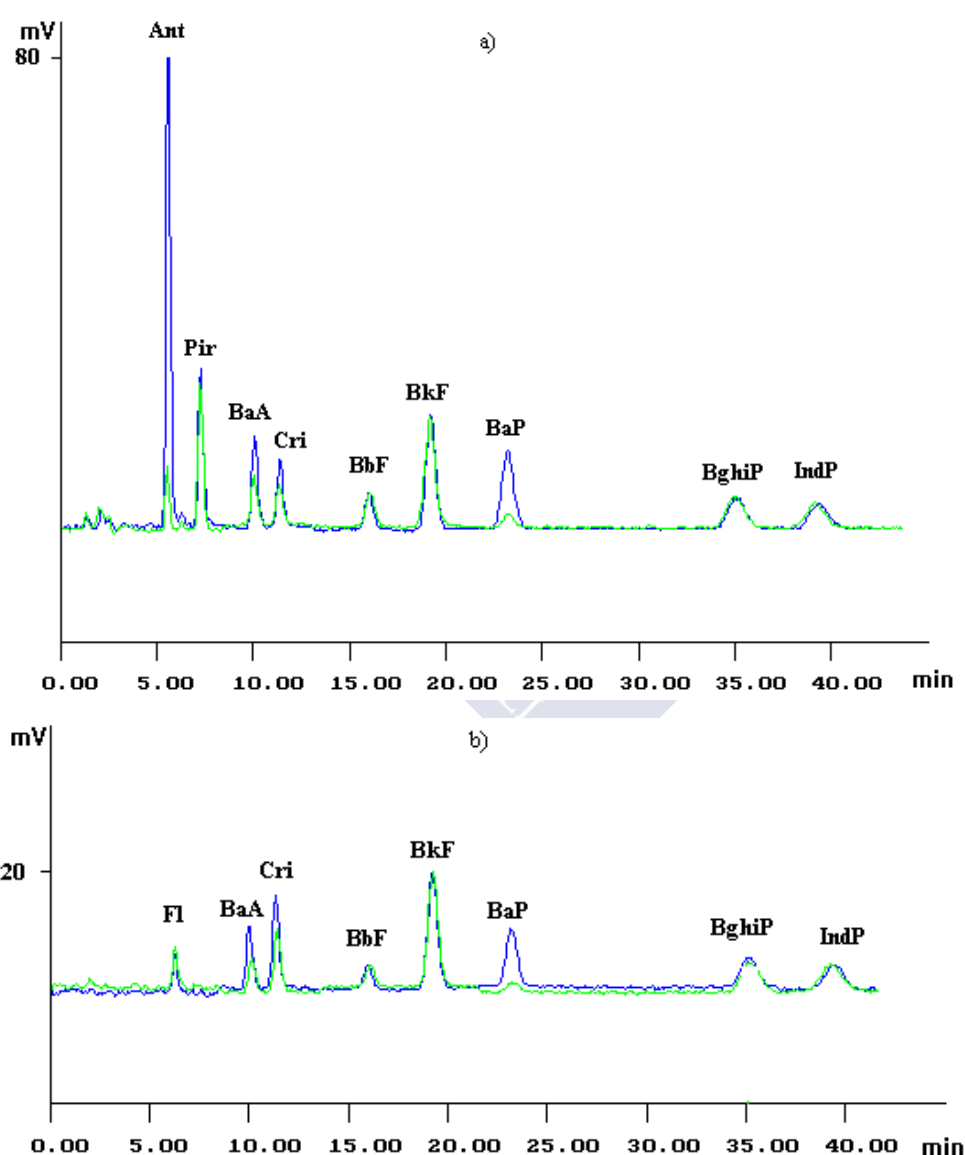


Fig. 89. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs antes y después de ser sometido durante 16 h en lámpara UV a 254 nm en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

4.2.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Los resultados obtenidos de las 133 muestras analizadas cuyas características están recogidas en la Tabla 4, correspondientes a 56 muestras de Ratónero (R), 12 de Cárabo (C) y 65 de Lechuza (L), así como el porcentaje de humedad, y la cantidad de muestra seca extraída, son recogidos en las Tablas 24-26.

De los resultados obtenidos en las Tablas, se puede observar que:

- 1) No se encuentran Cri, BghiP e IndP en ninguna de las 133 vísceras analizadas.
- 2) Sólo se encuentra: BaP en una muestra de corazón de Hembra Adulta de la especie diurna ratónero (R-1) recogida en la provincia de La Coruña (Fig. 90), en una cantidad de 1.16 µg/kg, y BkF en una muestra de hígado de una Hembra Adulta de la especie nocturna lechuza (L-3) recogida en la provincia de Orense (Fig. 91), en una cantidad de 0.22 µg/kg.
- 3) BbF en dos vísceras de hígado de una Hembra Adulta (L-7) y un Macho Adulto (L-9) de la especie nocturna lechuza recogidas en la provincia de Pontevedra, encontrando una cantidad de 1.24 y 4.47 µg/kg, respectivamente.
- 4) Por tanto, los PAHs que se encuentran presentes en las tres especies de aves rapaces analizadas son el Ant, Fl, Pir y BaA.

Tabla 24. Contenido de humedad (p/p), peso de muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de ratonero.

Muestra	Viscera	%Humedad	Ms	Ant	Fl	Pir	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	BghiP	IndP
R-1	Riñón	78.95	0.3002	ND	ND	5.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-2	Riñón	72.17	0.4507	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Riñón	77.19	0.2404	ND	5.61	6.70	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND
R-4	Riñón	75.00	0.1889	ND	ND	3.49	3.81	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-6	Riñón	78.73	0.2282	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Riñón	77.98	0.2276	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Riñón	79.42	0.2289	ND	ND	2.70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Riñón	81.89	0.1999	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-10	Riñón	80.75	0.0848	ND	ND	8.73	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-2	Músculo	68.31	1.3288	ND	ND	0.33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Músculo	74.06	0.3221	ND	ND	NQ	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND
R-4	Músculo	62.25	1.3435	ND	1.66	NQ	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-5	Músculo	78.03	0.8239	ND	3.11	2.15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-6	Músculo	68.26	1.2319	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Músculo	75.29	0.0846	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Músculo	77.43	0.8171	ND	ND	0.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Músculo	80.11	0.5266	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND
R-10	Músculo	79.23	0.5164	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-1	Pulmón	82.02	0.2085	ND	ND	6.21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-2	Pulmón	71.88	0.4134	ND	ND	1.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Pulmón	72.36	0.1500	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-4	Pulmón	72.71	0.1788	ND	ND	NQ	2.76	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-5	Pulmón	81.85	0.2556	ND	NQ	7.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-6	Pulmón	75.78	0.2427	ND	ND	ND	0.88	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Pulmón	82.54	0.1951	ND	ND	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Pulmón	82.08	0.0560	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Pulmón	84.71	0.2937	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-10	Pulmón	85.10	0.0982	ND	ND	5.95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-2	Hígado	72.00	1.2415	ND	ND	ND	0.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Hígado	72.84	0.1811	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-4	Hígado	68.78	0.9256	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-5	Hígado	73.05	0.8725	ND	2.45	1.59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-6	Hígado	73.75	1.2496	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Hígado	69.18	0.5471	ND	ND	0.53	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Hígado	71.57	0.6670	ND	ND	0.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Hígado	75.13	0.5884	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-10	Hígado	74.41	0.4646	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-1	Corazón	80.88	0.2817	ND	ND	12.6	ND	ND	NQ	ND	1.16	ND	ND
R-2	Corazón	67.45	0.8385	ND	ND	0.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Corazón	78.99	0.3630	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-4	Corazón	70.02	1.1023	NQ	1.82	1.11	0.77	NQ	ND	ND	ND	ND	ND
R-5	Corazón	78.44	0.3219	ND	ND	15.1	ND	ND	ND	ND	NQ	ND	ND
R-6	Corazón	72.35	0.8003	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Corazón	72.28	0.2358	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Corazón	79.09	0.3547	0.37	NQ	3.55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Corazón	81.64	0.4083	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-10	Corazón	79.86	0.3456	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-2	Intestino	71.59	1.2287	ND	1.19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-3	Intestino	81.17	0.3552	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-4	Intestino	57.52	1.3706	ND	0.95	0.40	0.24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-5	Intestino	80.68	0.2267	ND	10.5	12.4	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND
R-6	Intestino	72.05	1.1367	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-7	Intestino	80.95	0.4929	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-8	Intestino	83.26	0.2137	ND	15.45	8.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-9	Intestino	83.33	0.4958	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R-10	Intestino	86.88	0.2405	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 25. Contenido de humedad (p/p), peso de muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de cárbano.

Muestra	Viscera	%Humedad	Ms	Ant	Fl	Pir	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	BghiP	IndP
C-1	Riñón	74.47	0.1726	ND	9.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-2	Riñón	79.07	0.0944	0.94	13.0	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-1	Músculo	71.94	0.7460	0.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-2	Músculo	76.77	0.2347	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-1	Pulmón	73.74	0.0371	NQ	36.1	8.48	NQ	ND	ND	NQ	ND	ND	ND
C-2	Pulmón	76.98	0.0841	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-1	Hígado	71.44	0.7116	0.15	1.88	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND
C-2	Hígado	74.51	0.7104	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-1	Corazón	71.61	0.2419	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-2	Corazón	78.47	0.1739	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-1	Intestino	75.46	0.1883	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C-2	Intestino	80.92	0.1829	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 26. Contenido de humedad (p/p), peso de muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de lechuga.

Muestra	Viscera	%Humedad	Ms	Ant	Fl	Pir	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	BghiP	IndP
L-1	Riñón	76.92	0.0790	1.68	NQ	9.30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-2	Riñón	79.63	0.1273	0.87	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Riñón	76.56	0.0630	NQ	22.6	8.65	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND
L-4	Riñón	79.39	0.1135	NQ	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Riñón	78.13	0.0676	1.79	NQ	4.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Riñón	78.35	0.0594	1.40	25.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Riñón	76.92	0.1324	ND	11.1	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-8	Riñón	71.26	0.1966	1.28	10.1	2.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Riñón	76.78	0.0576	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-10	Riñón	78.23	0.1351	NQ	NQ	1.96	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Riñón	72.88	0.1230	ND	ND	ND	5.34	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-1	Músculo	75.91	0.3559	0.53	4.42	0.97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Músculo	74.58	0.8853	0.17	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-4	Músculo	76.75	0.3240	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Músculo	77.97	0.7746	0.26	2.16	0.54	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Músculo	78.02	0.3841	NQ	NQ	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Músculo	77.72	0.6478	0.14	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-8	Músculo	69.85	0.7068	0.50	4.16	0.76	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Músculo	76.40	0.2185	0.56	6.77	NQ	0.96	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-10	Músculo	75.67	0.3596	ND	3.90	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Músculo	71.92	1.2197	ND	NQ	0.58	0.77	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 26 (Cont). Contenido de humedad (p/p), peso de muestra seca extraída y PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca en las muestras de lechuga.

Muestra	Viscera	%Humedad	Ms	Ant	Fl	Pir	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	BghiP	IndP
L-1	Pulmón	78.96	0.0641	NQ	ND	7.92	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-2	Pulmón	80.58	0.0978	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Pulmón	79.18	0.0522	ND	ND	7.76	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-4	Pulmón	82.30	0.0581	ND	ND	9.72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Pulmón	77.16	0.1406	NQ	NQ	3.37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Pulmón	81.88	0.0304	3.09	54.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Pulmón	76.40	0.0552	1.91	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-8	Pulmón	71.45	0.0688	4.02	NQ	0.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Pulmón	78.63	0.0616	ND	26.3	4.42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-10	Pulmón	80.06	0.0695	ND	NQ	5.12	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Pulmón	74.07	0.0555	ND	ND	22.7	53.5	ND	ND	ND	NQ	ND	ND
L-1	Hígado	73.84	0.4335	0.21	4.19	0.71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-2	Hígado	76.58	0.7452	ND	1.74	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Hígado	75.08	0.2800	0.39	4.74	1.58	ND	ND	ND	0.22	ND	ND	ND
L-4	Hígado	76.22	0.5350	0.22	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Hígado	72.65	0.4024	0.49	NQ	1.59	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Hígado	73.93	0.2393	0.70	6.28	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Hígado	71.52	0.9023	0.17	ND	0.42	ND	ND	1.24	ND	ND	ND	ND
L-8	Hígado	68.88	0.4043	1.13	3.63	1.37	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Hígado	74.19	0.2397	ND	6.05	1.69	ND	ND	4.47	NQ	ND	ND	ND
L-10	Hígado	73.38	0.3727	0.28	ND	0.93	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Hígado	71.08	0.8174	ND	ND	1.32	2.54	ND	ND	ND	NQ	ND	ND
L-1	Corazón	76.43	0.1811	NQ	8.11	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-2	Corazón	78.21	0.1500	0.68	8.99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Corazón	77.52	0.1646	NQ	NQ	1.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-4	Corazón	77.22	0.1965	NQ	7.12	ND	2.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Corazón	78.09	0.2037	0.40	6.35	7.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Corazón	77.22	0.1672	0.83	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Corazón	76.68	0.1712	0.63	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-8	Corazón	66.69	0.3043	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Corazón	75.17	0.2033	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-10	Corazón	78.15	0.1813	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Corazón	72.47	0.2594	ND	ND	2.27	5.51	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-1	Intestino	79.73	0.0930	NQ	NQ	2.86	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-2	Intestino	81.71	0.2046	ND	6.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-3	Intestino	83.09	0.0852	ND	NQ	NQ	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND
L-4	Intestino	82.61	0.1398	ND	NQ	5.23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-5	Intestino	84.19	0.0621	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-6	Intestino	80.81	0.1139	0.93	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-7	Intestino	84.69	0.0465	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-8	Intestino	75.81	0.2874	0.64	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-9	Intestino	86.67	0.0164	NQ	81.0	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-10	Intestino	85.10	0.0910	ND	NQ	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-11	Intestino	75.78	0.2036	ND	ND	12.2	23.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

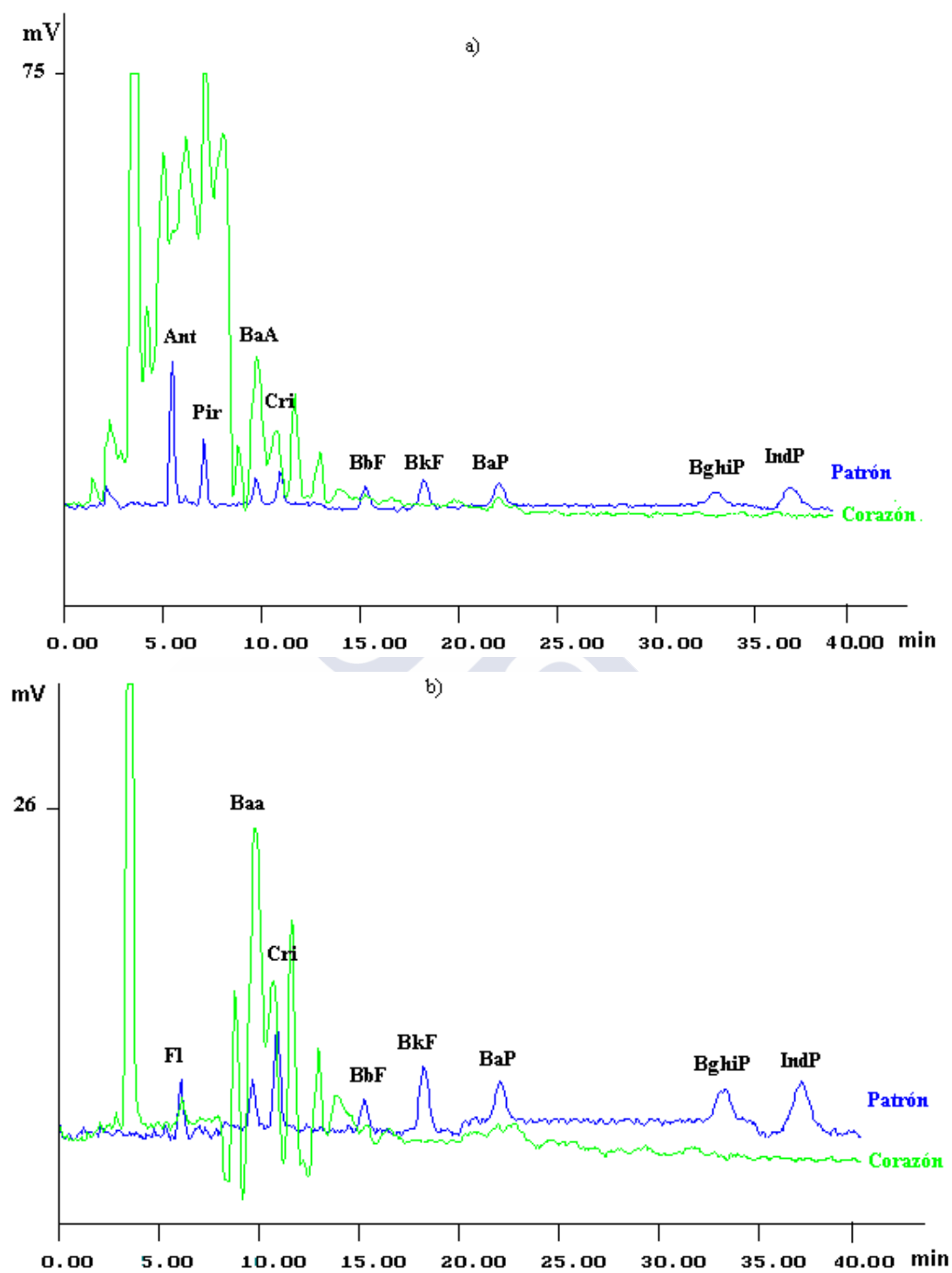


Fig. 90. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y del corazón de la muestra R-1 en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

Relación de áreas del BaA en la muestra: 0.76.

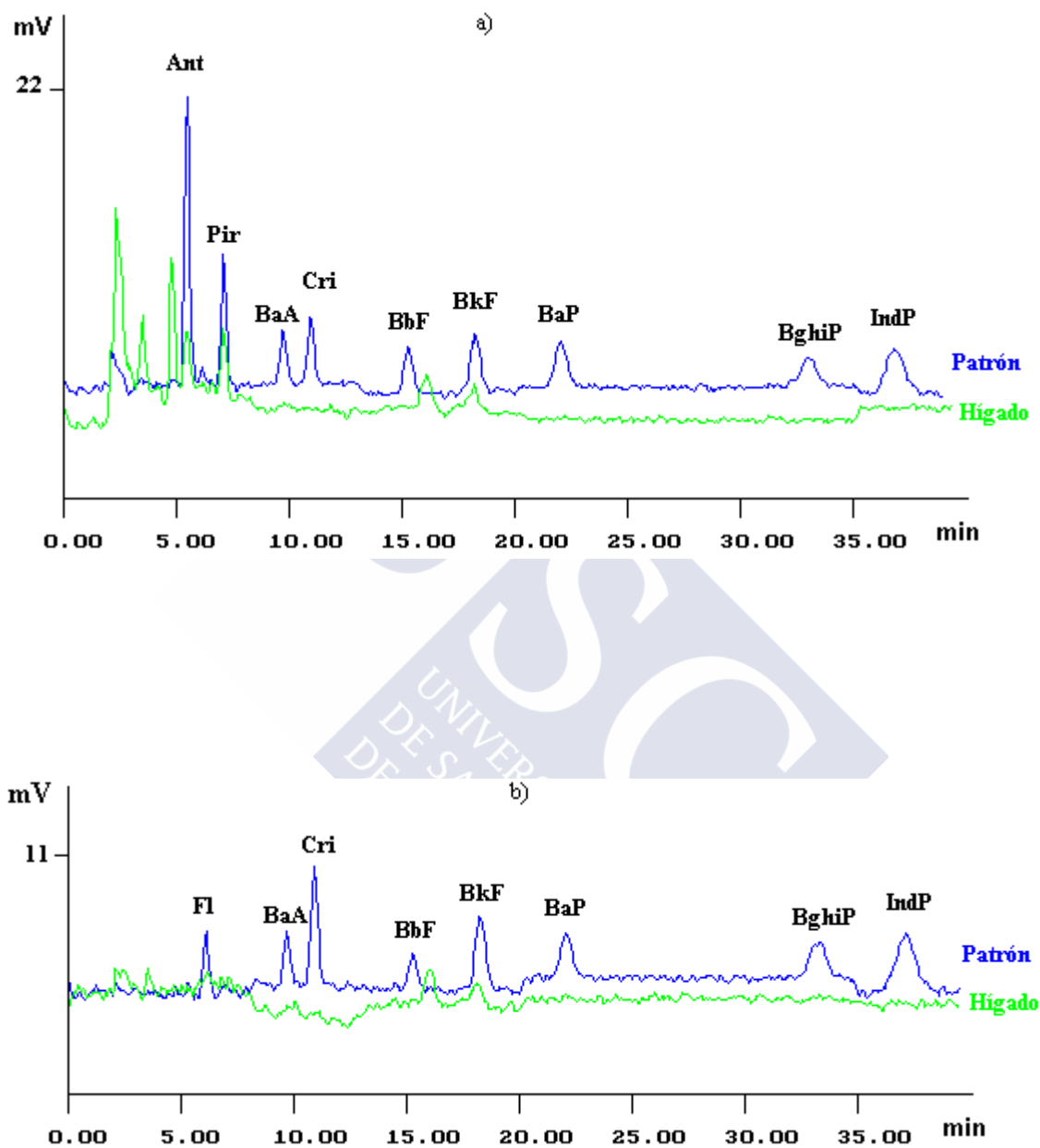


Fig. 91. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y del hígado de la muestra L-3 en: a) condiciones de inyección 1, y b) condiciones de inyección 2.

Relación de áreas del BkF en la muestra: 0.99.

Analizando los resultados encontrados en función del tipo de especie analizada, se observa que:

1) Para el ratonero (56 vísceras analizadas):

- sólo se encuentra Ant en una víscera (1.78%), correspondiente al corazón de un macho adulto de la provincia de Orense (R-8) con un valor de 0.37 µg/kg.
- Fl se encuentra en nueve vísceras (16.1%), en un rango de 0.95 µg/kg en el intestino de una hembra adulta de la provincia de La Coruña (R-4) a 15.4 µg/kg en el intestino de un macho adulto de la provincia de Orense (R-8), encontrando otro valor alto de 10.5 µg/kg en el intestino de un macho adulto de Lugo (R-5).
- Pir se encuentra en veintitrés vísceras (41.1%), en un rango de 0.40 µg/kg en el intestino de una hembra adulta de la provincia de La Coruña (R-4) a 15.1 µg/kg en el corazón de un macho adulto de Lugo (R-5), encontrando otros valores altos de 12.6 µg/kg en el corazón de una hembra adulta de la provincia de La Coruña (R-1) y 12.4 µg/kg en el intestino de un macho adulto de Lugo (R-5).
- BaA se encuentra en siete vísceras (12.5%), en un rango de 0.18 µg/kg en músculo de una hembra adulta de la provincia de la Coruña (R-4) a 3.81 µg/kg en el riñón de una hembra adulta de la provincia de La Coruña (R-4).

Por tanto, se observa que el PAH presente en mayor número de vísceras es el Pir (41.1%), seguido del Fl (16.1%) con las concentraciones más altas (Saber y col, 1991; Al-Yakoob y col., 1993; Cardellicchio y col., 1996), el BaA se encuentra en menor proporción (12.5%), y sólo en un 1.78% el Ant y BaP.

De las diez aves estudiadas, tres presentan niveles de polución en cinco de las vísceras analizadas (R-8, R-5 y R-4) (Fig. 92), y solamente hay un ave en la que no se detecta ninguno de los PAHs estudiados (R-9).

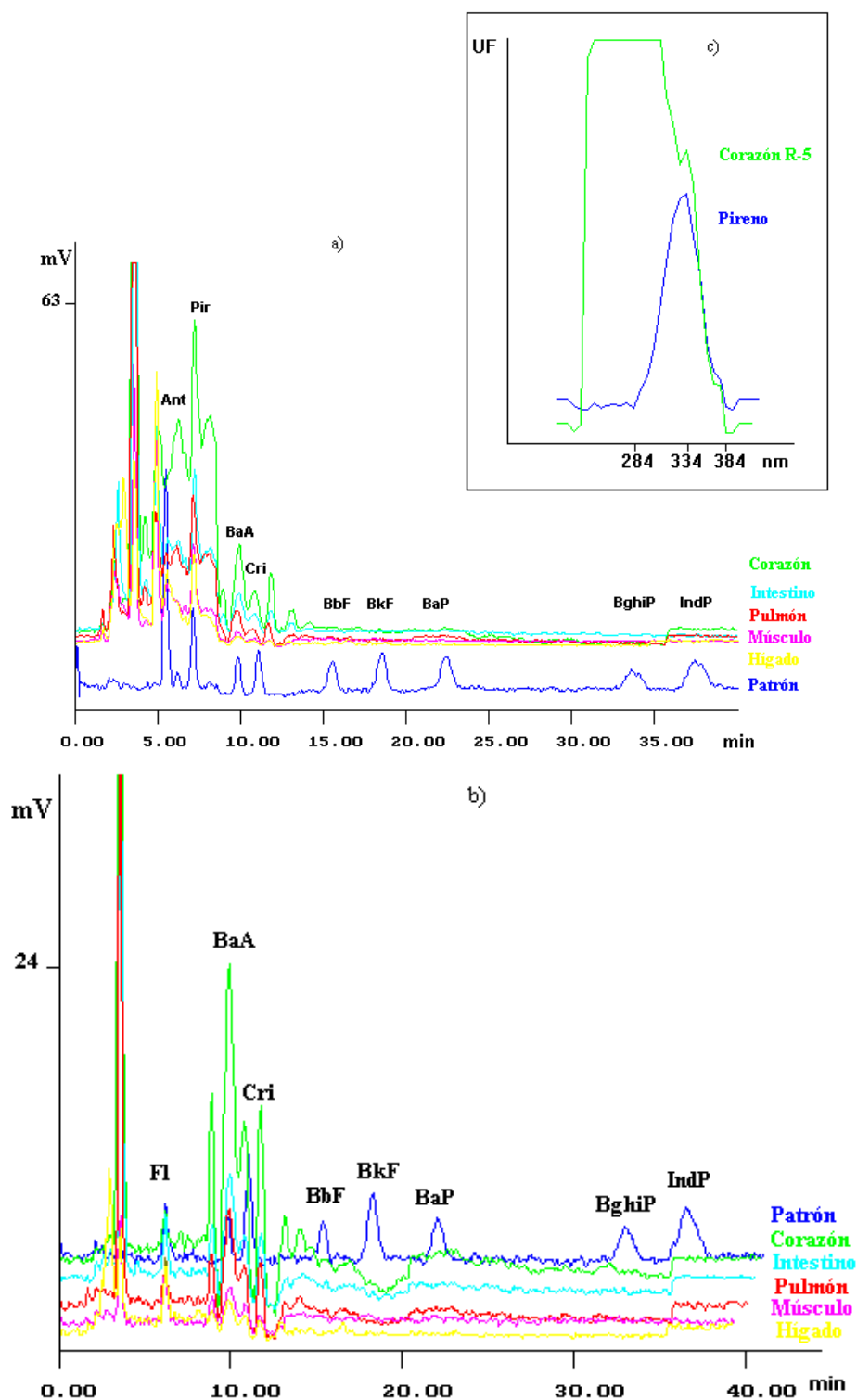


Fig. 92. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra R-5 en: a) condiciones de inyección 1, b) condiciones de inyección 2, y c) espectro sincrónico de confirmación del Pireno.

Relación de áreas del BaA en la muestra: 0.80.

Se observa que, en general, los PAHs presentes en un ave determinada, son los mismos en sus diferentes vísceras, aunque varían sus concentraciones (Fig. 92).

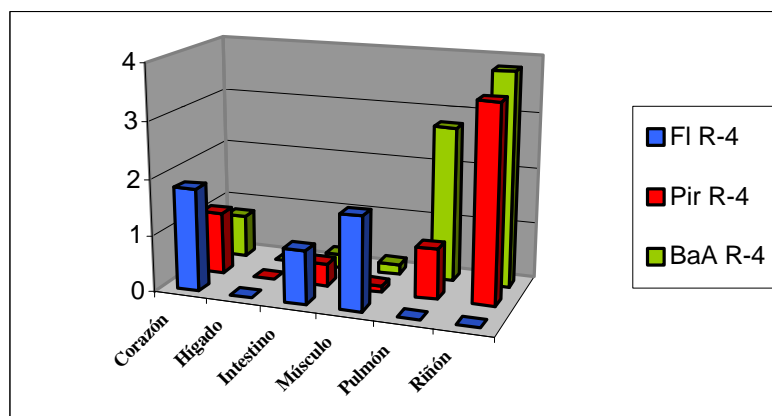


Fig. 93. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra R-4.

2) Para el Cárabo (12 vísceras analizadas):

- se encuentra Ant en tres vísceras (25.0%), en un rango de $0.12 \mu\text{g/kg}$ en el músculo de un macho adulto de la provincia de Pontevedra (C-1) a $0.94 \mu\text{g/kg}$ en el riñón de una hembra adulta de la provincia de Pontevedra (C-2).
- Fl se encuentra en cuatro vísceras (33.3%), en un rango de $1.88 \mu\text{g/kg}$ en el hígado C-1 a $36.1 \mu\text{g/kg}$ en el pulmón de la misma ave.
- Pir se encuentra sólo en una víscera (8.33%), con un valor de $8.48 \mu\text{g/kg}$, también en el pulmón C-1.

Se observa que los PAHs presentes en un mayor número de vísceras son el Fl (33.3%) y el Ant (25.0%), Pir (8.33%) y el BaA que sólo se detecta (NQ).

De las dos aves analizadas (C-1 y C-2) (Fig. 94-95), se observa que en una de ellas sólo existen PAHs en el riñón (Fl y Ant), mientras que en la otra, salvo en el corazón e intestino están presentes esos dos PAHs en las otras vísceras, además del Pir.

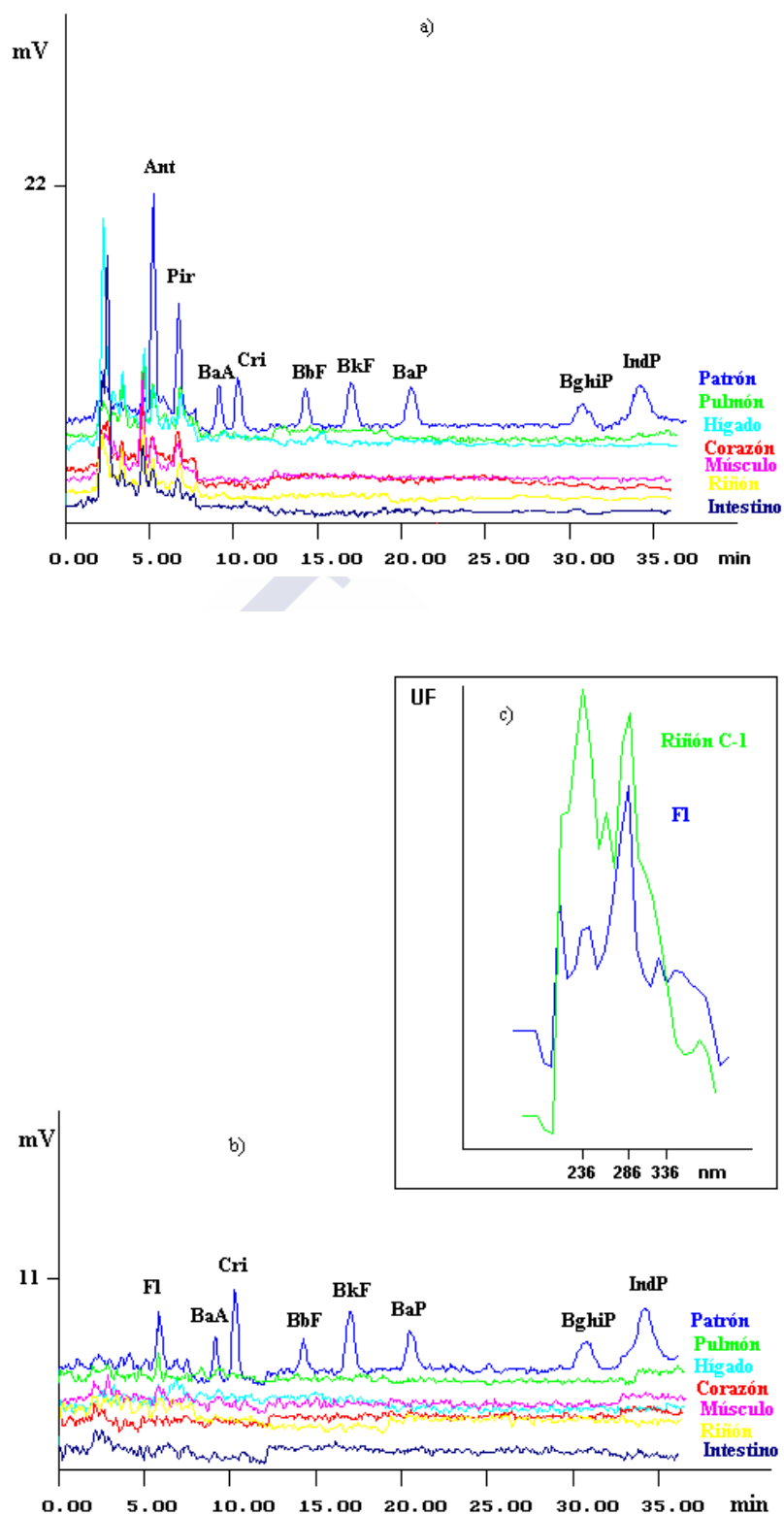


Fig. 94. Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra C-1 en: a) condiciones de inyección 1, b) condiciones de inyección 2, y c) espectro sincrónico de confirmación del Fluoranteno.

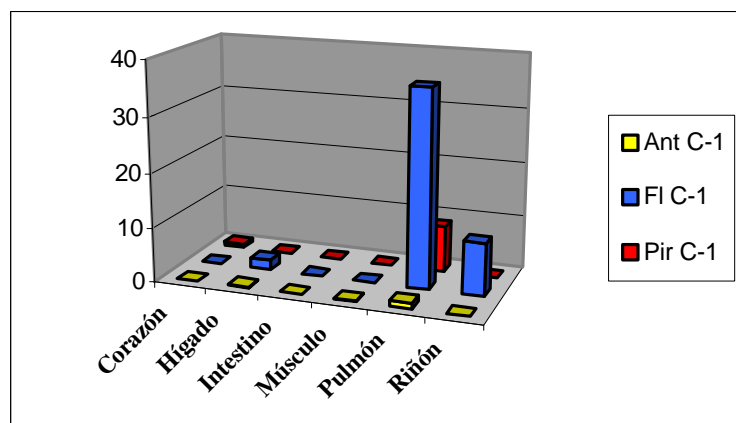


Fig. 95. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra C-1.

3) Para la lechuza (65 vísceras analizadas):

- se encuentra Ant en veintiocho vísceras (43.1%), en un rango de 0.14 $\mu\text{g/kg}$ en el músculo de un macho adulto de la provincia de Pontevedra (L-7) (Fig. 96) a 4.02 $\mu\text{g/kg}$ en el pulmón de una hembra adulta de la misma provincia (L-8).
- Fl se encuentra en veintitrés vísceras (35.4%), en un rango de 1.74 $\mu\text{g/kg}$ en el hígado de un macho adulto de Santiago (L-2) a 81.0 $\mu\text{g/kg}$ en el intestino de un macho adulto de Pontevedra (L-9), encontrando otros valores altos de 54.0 $\mu\text{g/kg}$ en el pulmón de un macho adulto de la provincia de Pontevedra (L-6), 26.3 $\mu\text{g/kg}$ en el pulmón L-9, 25.2 $\mu\text{g/kg}$ en el riñón L-6, y 22.6 $\mu\text{g/kg}$ en el riñón de una hembra adulta de Orense (L-3).
- Pir se encuentra en treinta y tres vísceras (47.7%), en un rango de 0.42 $\mu\text{g/kg}$ en el hígado de una hembra adulta de la provincia de Pontevedra (L-7) a 22.7 $\mu\text{g/kg}$ en el pulmón de una hembra adulta L-11.

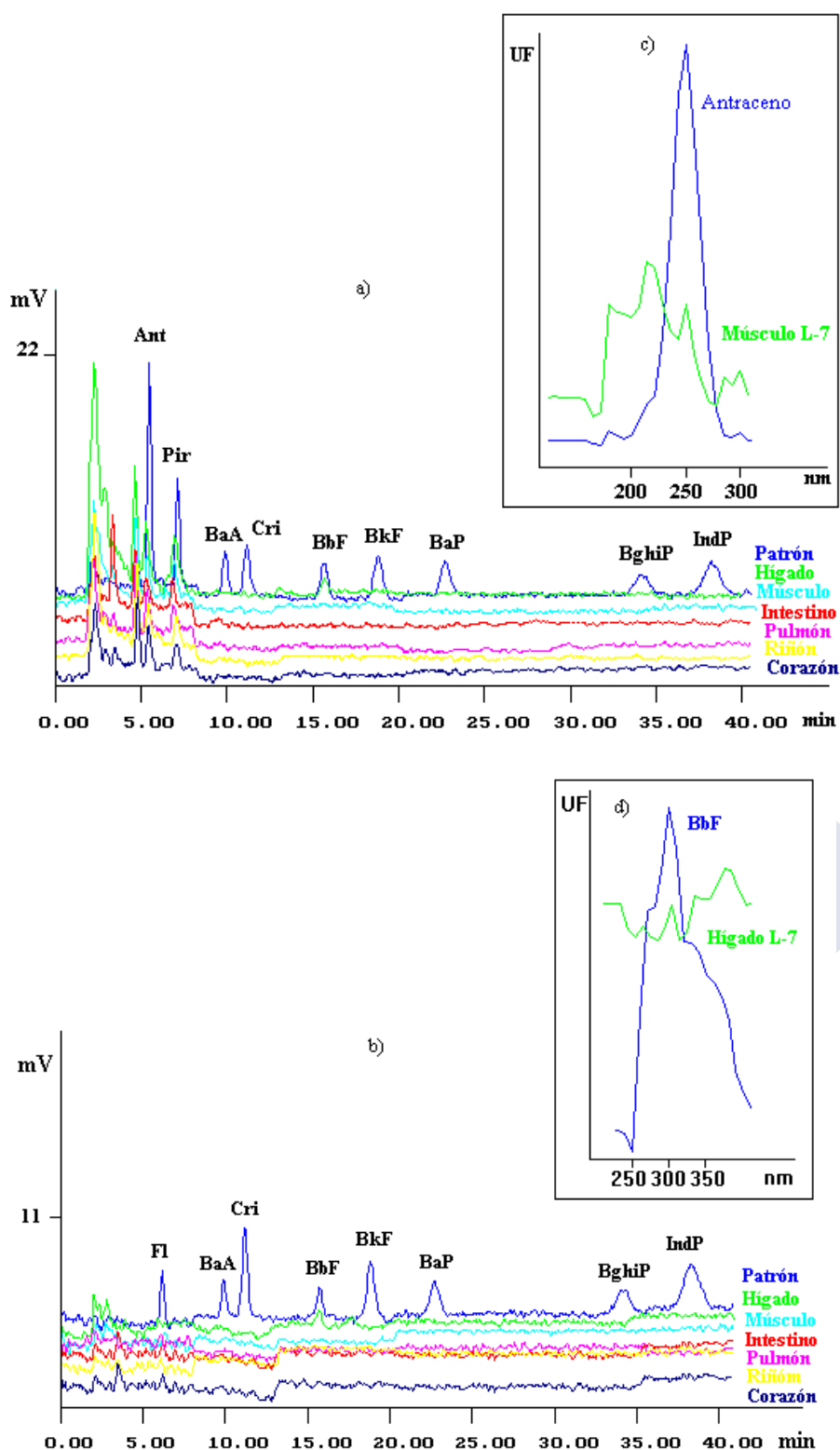


Fig. 96 Cromatogramas de HPLC-FL de un patrón de los diez PAHs y de las vísceras de la muestra L-7 en: a) condiciones de inyección 1, b) condiciones de inyección 2, c) espectro sincrónico de confirmación del Antraceno, y d) espectro sincrónico de confirmación del Antraceno Benzo[b]fluoranteno.

Relación de áreas del BbF en la muestra: 1.71.

- BaA se encuentra en ocho vísceras (12.3%), en un rango de 0.96 $\mu\text{g/kg}$ en músculo de un macho adulto de Pontevedra (L-9) a 53.5 $\mu\text{g/kg}$ en pulmón de una hembra adulta (L-11).

Los PAHs presentes en un mayor número de vísceras son el Pir (47.7) y el Ant (43.1), seguidos del Fl (35.4), BaA (12.3%), BbF (3.08%) y sólo en un 1.54% el BkF.

En general, se observa igual que en el ratonero, que en cada ave se repite la presencia de determinados PAHs, aunque en diferentes concentraciones en función del tipo de víscera (Fig. 97).

En casi todas las vísceras pertenecientes a las once aves estudiadas, se encuentran presentes alguno de los PAHs analizados, siendo el intestino el que presenta menor grado de polución.

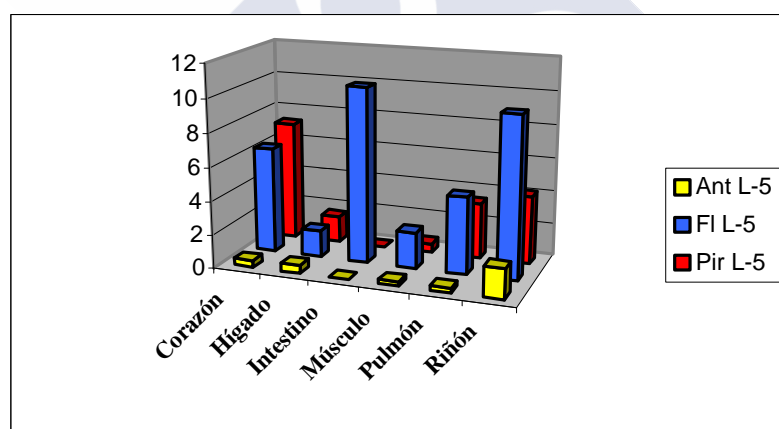


Fig. 97. Niveles de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, encontrados en las vísceras de la muestra L-5.

Aplicado el programa STATGRAPHICS a los resultados obtenidos se han calculado una serie de variables estadísticas en función de los distintos factores:

a) Aplicado en función de la especie de ave de presa analizada: ratonero (Tabla 27), cárabo (Tabla 28) y lechuza (Tabla 29).

Tabla 27. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie ratonero.

	Fl	Pir	BaA
Nº de muestra	56	56	56
Media	0.7630	1.928	0.1620
Desviación estándar	2.600	3.639	0.6370
Mediana	ND	ND	ND
Moda	ND	ND	ND
Varianza	6.760	13.24	0.4060
Mínimo	ND	ND	ND
Máximo	15.45	15.06	3.810
Cuartil inferior	ND	ND	ND
Cuartil superior	ND	1.870	ND
Asimetría	4.510	2.130	4.850
Aplastamiento	21.72	3.920	24.27

En el ratonero, los niveles máximos de polución corresponden al Pir (media 1.928 µg/kg) seguido del Fl (0.7630 µg/kg) y BaA (0.1620 µg/kg). Considerando el cuartil inferior de las muestras, no se detecta ningún PAH, y considerando el cuartil superior de las muestras sólo Pir (1.870 µg/kg). Además sólo el Pir presenta una distribución normal.

Tabla 28. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie cábaro.

	Ant	Fl
Nº de muestra	12	12
Media	0.1008	5.048
Desviación estándar	0.2690	10.71
Mediana	ND	ND
Moda	ND	ND
Varianza	0.0726	114.7
Mínimo	ND	ND
Máximo	0.9400	36.09
Cuartil inferior	ND	ND
Cuartil superior	0.0600	5.740
Asimetría	3.245	2.615
Aplastamiento	10.82	7.206

En el cábaro, se ha encontrado Fl (valor medio de 5.048 µg/kg) y Ant (0.1008 µg/kg). Considerando el cuartil inferior de las muestras no se detecta ningún PAH, mientras que considerando el cuartil superior se encuentran ambos PAHs. Ninguno de los dos presenta una distribución normal, pero se aproxima bastante.

Tabla 29. Variables estadísticas de los resultados obtenidos en la especie lechuga.

	Ant	Fl	Pir	BaA
Nº de muestra	65	65	65	65
Media	0.3980	4.855	2.028	1.451
Desviación estándar	0.7470	12.82	3.893	7.238
Mediana	ND	ND	ND	ND
Moda	ND	ND	ND	ND
Varianza	0.5580	164.4	15.15	52.39
Mínimo	ND	ND	ND	ND
Máximo	4.020	80.99	22.70	53.52
Cuartil inferior	ND	ND	ND	ND
Cuartil superior	0.5300	4.420	1.960	ND
Asimetría	2.913	4.431	3.094	6.457
Aplastamiento	10.03	22.21	12.19	44.31

En las muestras de lechuga, los valores medios más altos corresponden al Fl (4.855 µg/kg) (Shchekaturina y col., 1995), seguidos del Pir (2.028 µg/kg), BaA (1.451 µg/kg) y Ant (0.3980 µg/kg). Considerando el cuartil inferior de las muestras, no se detecta ningún PAH, y considerando el cuartil superior de las muestras se encuentra Fl (4.420 µg/kg), Pir (3.094 µg/kg) y Ant (0.5300 µg/kg). Ningún PAH encontrado presenta una distribución simétrica.

b) Se ha realizado el análisis de la varianza (intervalo 95% y nivel de significación de 0.05), según el tipo de víscera analizada en cada especie, cuyos valores medios se recogen en la Tabla 30 y Fig. 98:

Tabla 30. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.

	Corazón	Hígado	Intestino	músculo	Pulmón	Riñón
Especie	Ratonero	ratonero	ratonero	ratonero	ratonero	ratonero
Nº de muestra	10	9	9	9	10	9
Fl	0.1820	0.2720	3.121	0.5300	ND	0.6230
Pir	3.313	0.2870	2.327	0.3400	2.101	3.028
BaA	0.0770	0.0510	0.0270	0.0200	0.3640	0.4230
Especie	Cárabo	cárabo	cárabo	cárabo	cárabo	cárabo
Nº de muestra	2	2	2	2	2	2
Ant	ND	0.0750	ND	0.0600	ND	0.4700
Fl	ND	0.9400	ND	ND	18.04	11.30
Especie	Lechuza	lechuza	lechuza	lechuza	lechuza	lechuza
Nº de muestra	11	11	11	10	11	11
Ant	0.2310	0.3260	0.1430	0.2160	0.8200	0.6380
Fl	2.779	2.421	7.963	2.141	7.299	6.278
Pir	1.014	0.8740	1.843	0.2850	5.582	2.414
BaA	0.6990	0.2310	2.139	0.1730	4.865	0.485

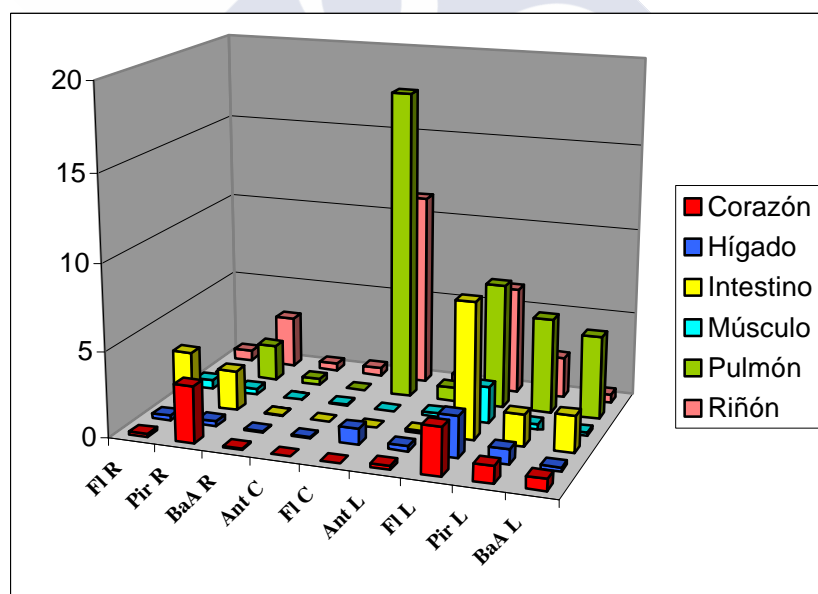


Fig. 98. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.

1) Para la especie ratonero:

a) Sólo se encuentra Ant y BaP en una víscera de corazón (0.3700 y 1.160 µg/kg, respectivamente).

b) El Fl se presenta en mayor concentración en el intestino con un valor medio de 3.121 µg/kg, seguido del riñón y músculo con valores medios de 0.6230 y 0.5300 µg/kg, respectivamente, y en menor concentración en el hígado y corazón con valores medios de 0.2720 y 0.1820 µg/kg, respectivamente.

c) El Pir se encuentra en mayor concentración en el corazón y riñón (valores medios de 3.313 y 3.028 µg/kg, respectivamente), seguidos de intestino y pulmón (2.327 y 2.101 µg/kg, respectivamente), y en menor concentración en músculo e hígado (0.3400 y 0.2870 µg/kg, respectivamente).

d) El BaA se encuentra en mayor concentración en el riñón y pulmón (valores medios de 0.4230 µg/kg y 0.3640 µg/kg, respectivamente), con valores mucho más bajos en el corazón (0.0770 µg/kg), hígado (0.0510 µg/kg), intestino y músculo (0.0270 y 0.0200 µg/kg, respectivamente).

En esta especie no se observan diferencias significativas entre el contenido de los diferentes PAHs encontrados y las diferentes vísceras analizadas. Se observa que las vísceras menos polucionadas son músculo e hígado, y las más polucionadas riñón e intestino.

2) Para la especie cárabo:

a) El Ant se presenta en mayor concentración en el riñón con valor medio de 0.4700 µg/kg, con valores mucho más bajos en el hígado y músculo (0.0750 y 0.0600 µg/kg, respectivamente)

b) El Fl está en mayor concentración en el pulmón con un valor medio de 18.04 µg/kg, seguido del riñón (11.30 µg/kg), y en menor concentración en el hígado (0.9400 µg/kg).

c) El Pir sólo se encuentra en una víscera de pulmón con un valor medio de 8.480 µg/kg.

En esta especie no se observan diferencias significativas entre el contenido de PAHs encontrado y la víscera analizada, siendo la víscera más polucionada el pulmón seguida del riñón.

3) Para la especie lechuga:

a) El Ant se encuentra en mayor concentración en el pulmón (valor medio de 0.8200 $\mu\text{g/kg}$), seguido del riñón (0.6380 $\mu\text{g/kg}$), hígado (0.3260 $\mu\text{g/kg}$), corazón y músculo (0.2301 y 0.2160 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente).

b) El Fl se presenta en mayor concentración en el intestino, pulmón y riñón con valores medios de 7.963, 7.299 y 6.278 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente, seguidos del corazón, hígado y músculo.

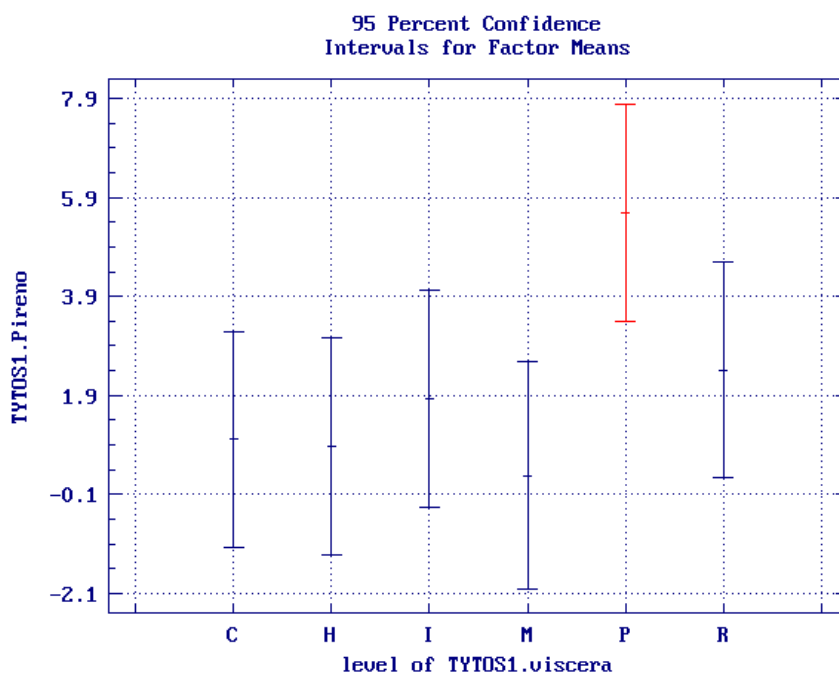
c) El Pir se encuentra en mayor concentración en el pulmón (valor medio de 5.582 $\mu\text{g/kg}$), presentando diferencias significativas con relación al corazón, hígado y músculo (Fig. 99) .

d) El BaA se encuentra en mayor concentración en el pulmón (4.865 $\mu\text{g/kg}$), e intestino (2.139 $\mu\text{g/kg}$), seguidos del corazón y riñón (0.6990 y 0.4850 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente), y en menor concentración en hígado y músculo.

e) BbF sólo se encuentra en dos vísceras de hígado, y BkF sólo se encuentra en una víscera de hígado (0.2200 $\mu\text{g/kg}$).

En esta especie, las vísceras más polucionadas son pulmón e intestino, y la menos polucionada el músculo.

De los resultados obtenidos en las tres especies analizadas, se observa que la víscera que presenta las cantidades más elevadas es el pulmón, seguida del intestino, mientras que las concentraciones más bajas corresponden al hígado y músculo.



C: corazón, H: hígado, I: Intestino, M: Músculo, P: Pulmón y R: Riñón.

Fig. 99. Análisis de la varianza de Pireno y las distintas vísceras de la lechuza.

c) Se ha realizado un análisis de varianza (intervalo 95% y nivel de significación de 0.05), por sexo, dentro de cada especie (Tabla 31 y Fig. 100):

Tabla 31. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo y especie

	Macho	Hembra
Especie	Ratonero	Ratonero
Nº de muestra	35	21
Fl	1.090	0.2100
Pir	2.240	1.400
BaA	0.0130	0.4100
Especie	Cárabo	Cárabo
Nº de muestra	6	6
Ant	0.0450	0.1570
Fl	7.928	2.168
Especie	Lechuza	Lechuza
Nº de muestra	23	42
Ant	0.4030	0.3960
Fl	10.00	2.036
Pir	0.9160	2.638
BaA	0.1360	2.172

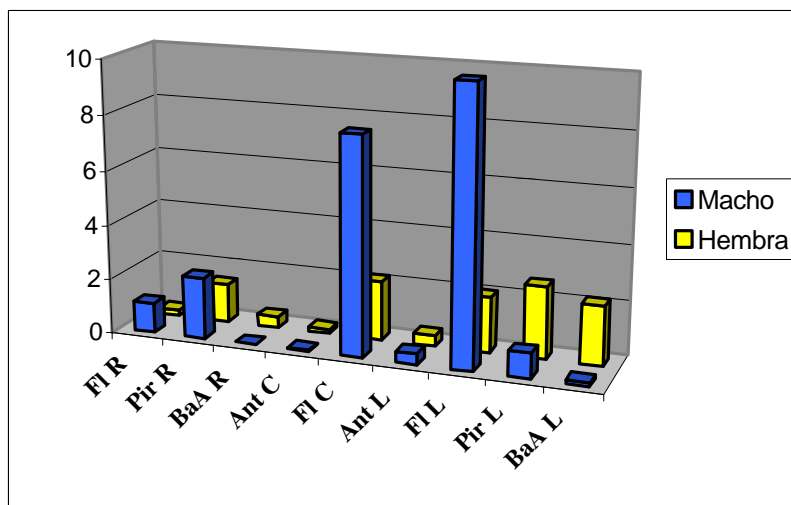


Fig. 100. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo y especie

Para el ratonero se encuentra mayor polución en los machos de Fl ($1.090 \mu\text{g/kg}$) y Pir ($2.240 \mu\text{g/kg}$) (Uthe y col., 1996), mientras que la mayor contaminación en las hembras es de BaA ($0.4100 \mu\text{g/kg}$).

Para el cárabo se encuentra mayor concentración de Fl en los machos ($7.928 \mu\text{g/kg}$), y de Ant en las hembras ($0.1570 \mu\text{g/kg}$).

Para la lechuga se encuentran valores más elevados de Fl en los machos ($10.00 \mu\text{g/kg}$), mientras que para el Pir y BaA se encuentran niveles mayores en las hembras (2.638 y $2.172 \mu\text{g/kg}$, respectivamente). No se observan diferencias en los niveles encontrados de Ant.

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que existe una mayor contaminación en los machos de Fl y de BaA en las hembras, pero en ningún caso se observa que presenten diferencias significativas.

d) También se ha realizado un análisis de varianza (intervalo 95% y nivel de significación de 0.05), comparando el contenido de los PAHs encontrados por edad (adultos e inmaduros), dentro de cada especie (Tabla 32 y Fig. 101)

Tabla 32. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.

	Adultos	Inmaduros
Especie	Ratonero	Ratonero
Nº de muestra	50	6
Fl	0.8550	ND
Pir	2.149	0.0883
BaA	0.1820	ND
Especie	Cárabo	Cárabo
Nº de muestra	6	SM
Ant	0.1008	SM
Fl	5.048	SM
Especie	Lechuza	Lechuza
Nº de muestra	59	6
Ant	0.3980	0.4030
Fl	5.065	2.787
Pir	1.866	3.627
BaA	1.599	ND

SM= Sin Muestra

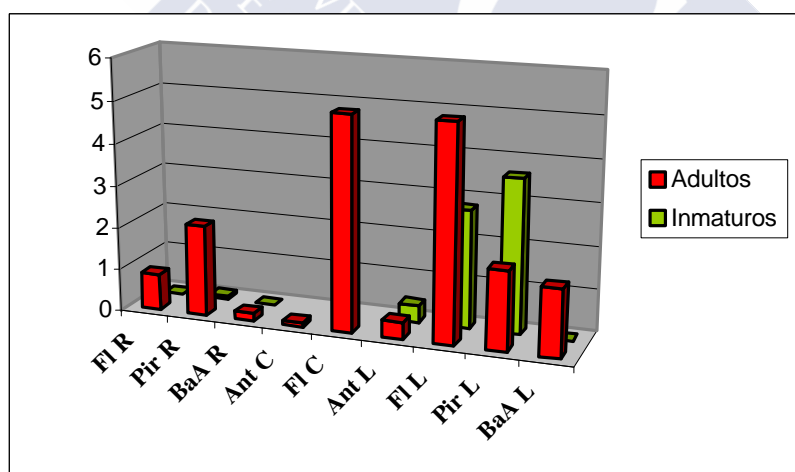


Fig. 101. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.

En esta Tabla, hay que destacar que el número de muestras analizadas de inmaduros ($n=12$), es muy inferior al número de muestras de adultos ($n=109$), y sólo en las especies de ratonero y lechuza. Se observa que las muestras de adultos están más

polucionadas que las de los inmaturos, excepto para el Pir en la especie lechuza. Para el Ant, en esa misma especie, se han encontrado niveles similares por edad. En ningún caso se observa que presenten diferencias significativas.

e) Se ha realizado así mismo con los resultados obtenidos, un análisis de la varianza (intervalo 95% y nivel de significación de 0.05), comparando el contenido de los PAHs encontrados por provincias, dentro de cada especie (Tabla 33 y Fig. 102).

Tabla 33. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.

	La Coruña	Lugo	Orense	Pontevedra
Especie	Ratonero	Ratonero	Ratonero	Ratonero
Nº de muestra	21	5	18	12
Fl	0.5350	3.212	0.8580	ND
Pir	1.826	7.790	0.8880	1.223
BaA	0.3910	ND	0.0489	ND
Especie	Cárabo	Cárabo	Cárabo	Cárabo
Nº de muestra	0	0	0	12
Ant	SM	SM	SM	0.1008
Fl	SM	SM	SM	5.048
Especie	Lechuza	Lechuza	Lechuza	Lechuza
Nº de muestra	11	0	12	42
Ant	0.3610	SM	0.0650	0.5036
Fl	3.095	SM	2.873	5.881
Pir	1.978	SM	2.886	1.797
BaA	ND	SM	0.1820	2.1945

SM= Sin Muestra

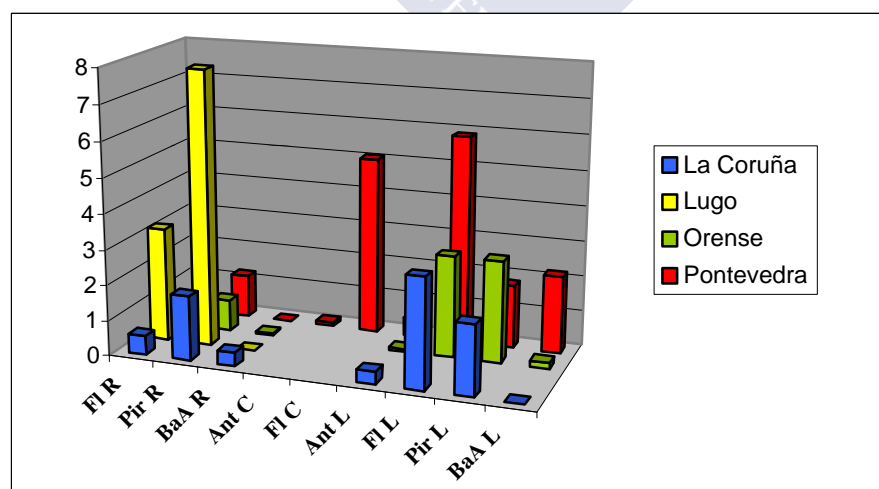


Fig. 102. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.

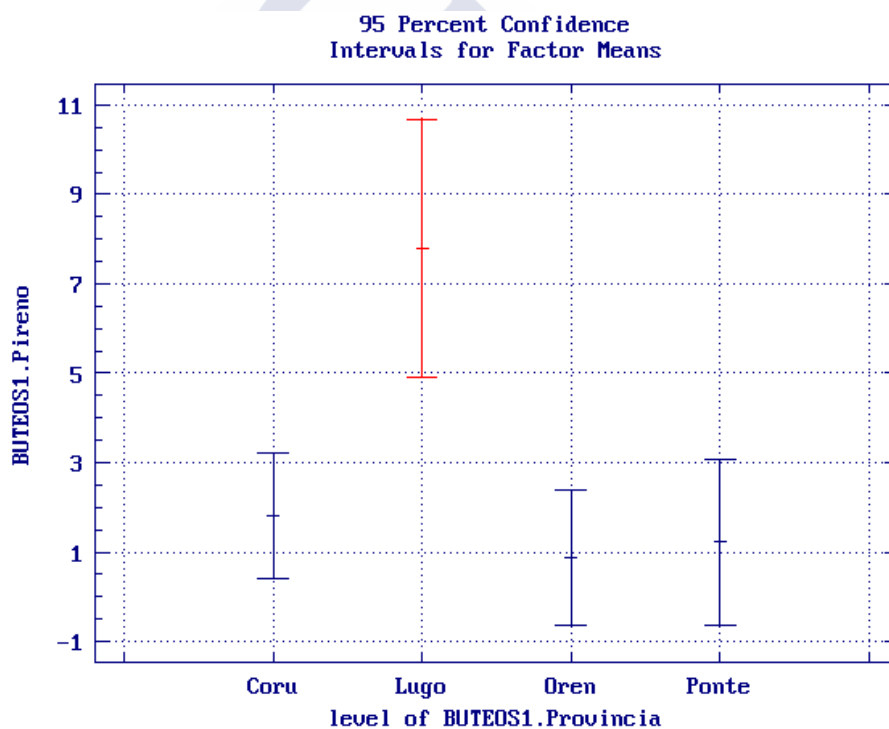
1) Para el ratonero:

a) Los niveles más altos de Fl se encuentran en la provincia de Lugo (3.212 $\mu\text{g/kg}$), seguidos de Orense (0.8580 $\mu\text{g/kg}$) y La Coruña (0.5350 $\mu\text{g/kg}$), no siendo detectados en Pontevedra.

b) Los valores más elevados de Pir se encuentran en la provincia de Lugo (7.790 $\mu\text{g/kg}$), seguido de las provincias de La Coruña y Pontevedra (1.826 y 1.223 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente), encontrando los valores más bajos en Orense (0.8880 $\mu\text{g/kg}$).

Respecto a los niveles encontrados de Pir, se observan diferencias significativas en la provincia de Lugo, con relación a las otras tres (Fig. 103).

c) BaA sólo se encuentra en la provincia de La Coruña (0.3910 $\mu\text{g/kg}$) y Orense (0.0489 $\mu\text{g/kg}$).



Coru: Coruña, Oren: Orense y Ponte: Pontevedra

Fig. 103. Análisis de la varianza de Pireno y las cuatro provincias del ratonero.

Observando todos los resultados en conjunto, los niveles más altos se obtienen en la provincia de Lugo.

2) Para el cárbano sólo se dispone de muestras de la provincia de Pontevedra.

3) Para la lechuga:

a) Los niveles más altos de Ant y Fl se encuentran en la provincia de Pontevedra (0.5036 y 5.881 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente), seguida de La Coruña (0.3610 y 3.095 $\mu\text{g/kg}$) y Orense (0.0650 y 2.873 $\mu\text{g/kg}$).

b) Para el Pir, las mayores concentraciones se encuentran en la provincia de Orense (2.886 $\mu\text{g/kg}$), seguido de La Coruña (1.978 $\mu\text{g/kg}$) y Pontevedra (1.797 $\mu\text{g/kg}$).

c) El BaA está en mayor cantidad en la provincia de Pontevedra (2.194 $\mu\text{g/kg}$), seguido de Orense (0.1820 $\mu\text{g/kg}$), no siendo detectado en La Coruña.

En la lechuga no se observan diferencias significativas de los niveles de PAHs encontrados con relación a las diferentes provincias. Si se observan todos los resultados en conjunto, los niveles más altos corresponden a la provincia de Pontevedra.

Niveles de totales

Se ha realizado un estudio estadístico, aplicando el programa STATGRAPHICS, a los niveles totales encontrados de PAHs ($\mu\text{g/kg}$, expresados en materia seca). Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 34

Tabla 34. Variables estadísticas de los niveles totales de PAHs.

n=133	Ant	Fl	Pir	BaA	BbF	BkF	BaP
Media	0.2066	3.149	1.867	0.7778	0.0429	$1.65 \cdot 10^{-3}$	$8.72 \cdot 10^{-3}$
Desviación estándar	0.5602	9.812	3.674	5.100	0.4014	0.0191	0.1006
Mediana	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Moda	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Varianza	0.3138	96.28	13.50	26.01	0.1612	$3.64 \cdot 10^{-4}$	0.0101
Mínimo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Máximo	4.020	80.99	22.70	53.52	4.470	0.2200	1.160
Cuartil inferior	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cuartil superior	ND	1.660	1.690	ND	ND	ND	ND
Asimetría	4.210	5.466	2.726	9.202	10.52	11.53	11.53
Aplastamiento	21.52	35.68	8.997	90.78	114.8	133.0	133.0

Los resultados obtenidos muestran que los PAHs que se encuentran en mayor concentración (valor medio), son el Fl (3.149 $\mu\text{g/kg}$) y Pir (1.867 $\mu\text{g/kg}$), seguidos del BaA (0.7778 $\mu\text{g/kg}$) y Ant (0.2066 $\mu\text{g/kg}$). Mientras que el BbF, BkF y BaP, se encuentran en niveles más bajos.

En el cuartil inferior de las muestras no se detecta ningún PAH, mientras que en el cuartil superior sólo se encuentran Fl y Pir, en una concentración ambos de 1.7 $\mu\text{g/kg}$.

Ningún PAH presenta una distribución simétrica, aunque el que más se aproxima es el Pir.

Se ha realizado un análisis de varianza según el tipo de víscera (Tabla 35 y Fig. 104), según el sexo (Tabla 36 y Fig. 106), según la edad (Tabla 37 y Fig. 107) y según la provincia (Tabla 38 y Fig. 108).

Tabla 35. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.

n=133	Corazón	Hígado	Intestino	Músculo	Pulmón	Riñón
	n=23	n=22	n=22	n=21	n=23	n=22
Ant	0.1265	0.1700	0.07136	0.1086	0.3922	0.3618
Fl	1.408	1.407	5.258	1.247	5.060	4.422
Pir	1.926	0.5541	1.873	0.2814	3.952	2.446
BaA	0.3678	0.1364	1.080	0.0909	2.485	0.4159

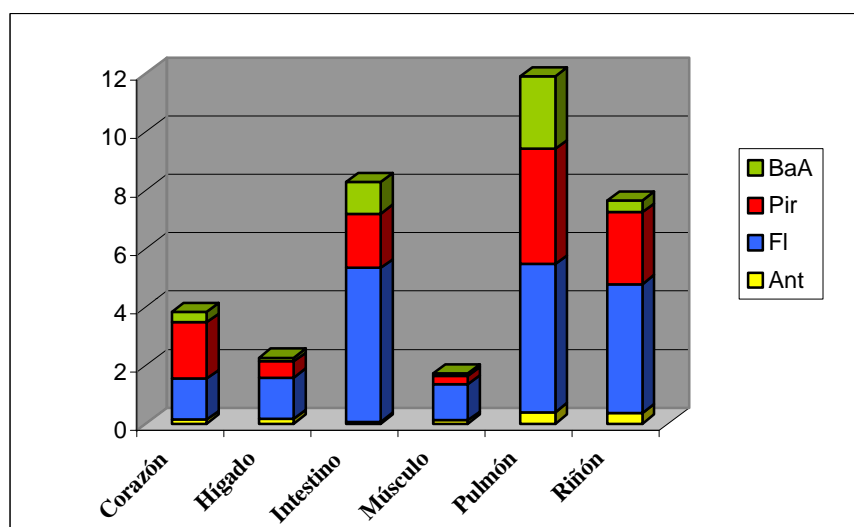
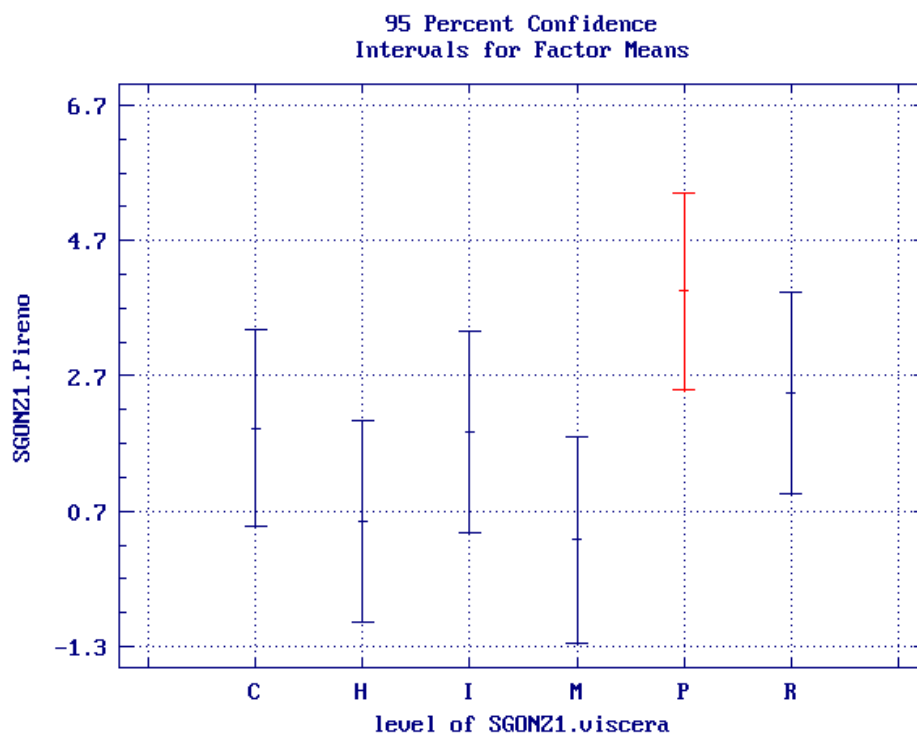


Fig. 104. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del tipo de víscera.

De los resultados recogidos en la Tabla, se observa que la víscera más contaminada, con las cantidades más elevadas para todos los PAHs, es el pulmón. También presentan un alto nivel de contaminación, el intestino, excepto para el Ant y el riñón. Los niveles más bajos corresponden al corazón, hígado y músculo.

Los niveles más altos encontrados en todas las vísceras, son para el Fl, seguido del Pir.

Sólo se observan diferencias significativas en los niveles de Pir encontrados en el pulmón con relación al hígado y músculo (Fig. 105).



C: corazón, H: hígado, I: Intestino, M: Músculo, P: Pulmón y R: Riñón.

Fig. 105. Análisis de la varianza de Pireno y las distintas vísceras.

Tabla 36. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo.

n=133	Macho	Hembra
	n=64	n=69
Ant	0.1550	0.2545
Fl	4.936	1.492
Pir	1.688	2.033
BaA	0.0562	1.447

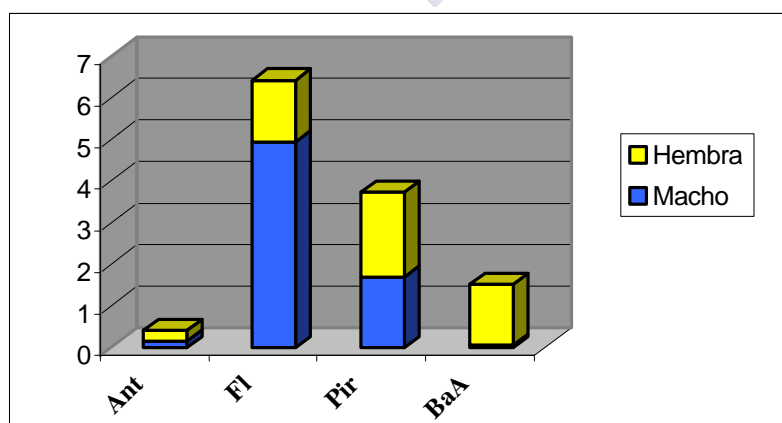


Fig. 106. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función del sexo.

Por sexo (Tabla 36) las hembras presentan los niveles más altos de los PAHs analizados, excepto para el Fl, que presenta los niveles más altos en los machos ($4.94 \pm 1.68 \mu\text{g/kg}$). El BaP y BkF, ambos sólo se encuentran en una muestra analizada, pertenecientes a una hembra. No se observan diferencias significativas.

Tabla 37. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.

n=133	Adultos	Inmaturos
	n=121	n=12
Ant	0.2071	0.2017
Fl	3.323	1.398
Pir	1.868	1.857
BaA	0.8550	ND

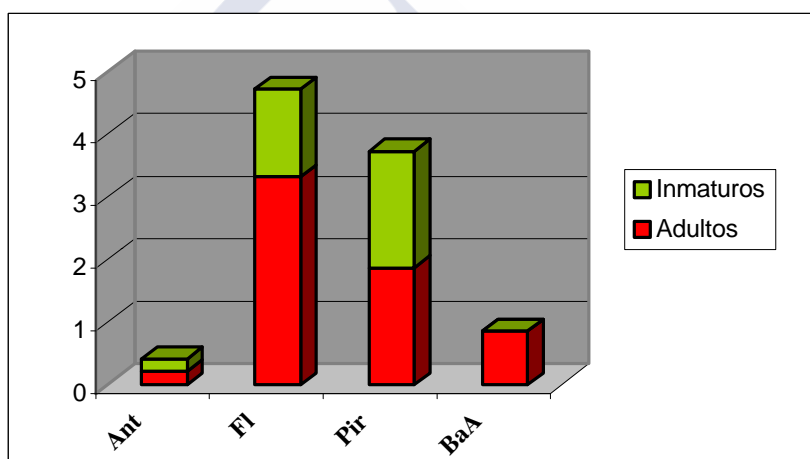


Fig. 107. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la edad.

No se observan diferencias significativas en los niveles encontrados de PAHs con relación a la edad (Tabla 37). Los niveles encontrados de Ant y Pir en adultos e inmaturos son similares. Los niveles de Fl encontrados, son más del doble en los adultos, y BaA sólo ha sido encontrado en las muestras de adultos.

Tabla 38. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.

n=133	La Coruña	Lugo	Orense	Pontevedra
	n=32	n=5	n=30	n=66
Ant	0.1241	ND	0.0383	0.3388
Fl	1.415	3.212	1.664	4.661
Pir	1.878	7.790	1.688	1.494
BaA	0.2560	ND	0.1020	1.396

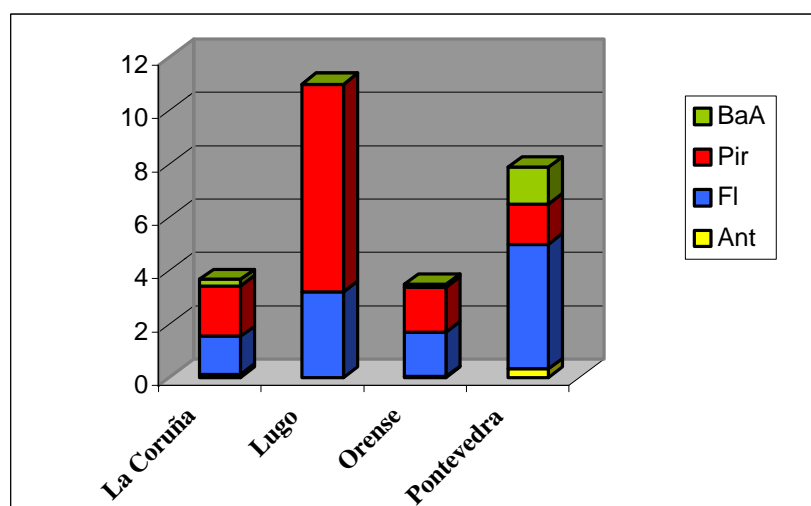
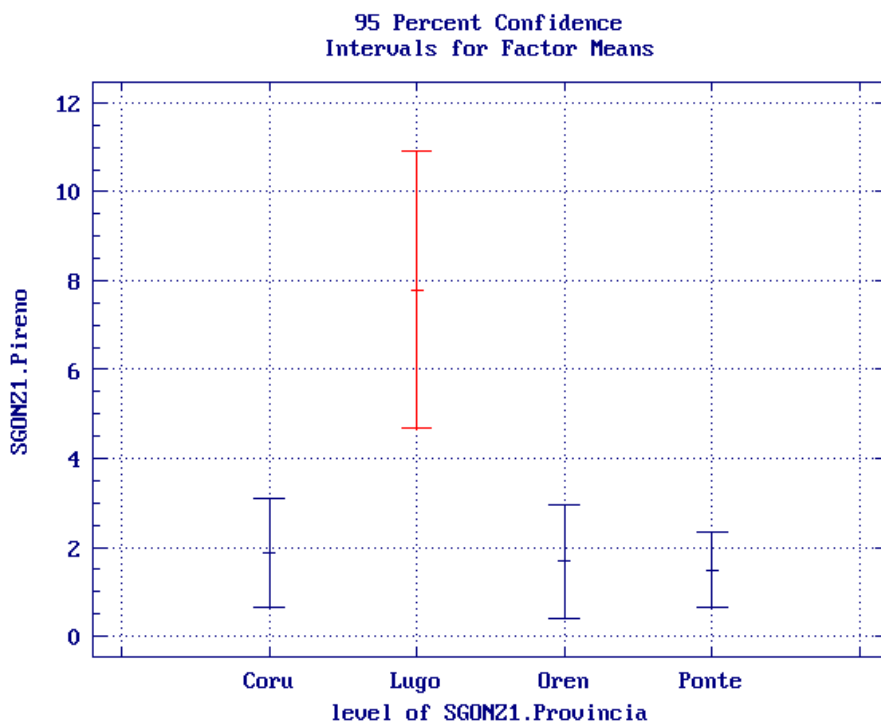


Fig. 108. Valores medios de PAHs ($\mu\text{g/kg}$) en materia seca, en función de la provincia.

Por provincias (Tabla 38) señalar que sólo se han analizado cinco muestras de la provincia de Lugo pertenecientes a la especie ratonero, y del cárabo sólo se han analizado muestras de la provincia de Pontevedra.

En la provincia de Pontevedra, se encuentran las cantidades más altas de Ant, Fl y BaA, mientras que las de Pir corresponden a la provincia de Lugo.

Se observa que sólo existen diferencias significativas en los niveles de Pir encontrados en la provincia de Lugo con relación a las otras tres provincias (Fig. 109).



Coru: Coruña, Oren: Orense y Ponte: Pontevedra

Fig. 109. Análisis de la varianza de Pireno y las cuatro provincias.

Finalmente se han comparado los resultados de PAHs encontrados en estas muestras con los resultados de hidrocarburos alifáticos, PCBs y PCTs obtenidos paralelamente en las mismas muestras de aves, ya que ambas Tesis Doctorales forman parte de un proyecto concedido por la Xunta de Galicia, titulado: "Estudio de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), policlorobifenilos (PCBs) y policloroterfenilos (PCTs) en aves rapaces y sus implicaciones en el ecosistema".

Se ha detectado la presencia de los analitos investigados en la mayoría de las muestras analizadas. En general, la especie menos polucionada es el cárabo, la especie que presenta los niveles más altos de hidrocarburos alifáticos y PCBs y más bajos de PAHs es la especie ratonero, mientras que la especie lechuza presenta los niveles más elevados de PAHs y niveles inferiores de hidrocarburos alifáticos y PCBs.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se propone la técnica de extracción de fluidos supercríticos para extraer diez hidrocarburos aromáticos policíclicos: Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[*a*]antraceno, Criseno, Benzo[*b*]fluoranteno, Benzo[*k*]fluoranteno, Benzo[*a*]pireno, Benzo[*ghi*]perileno e Indeno[1,2,3-*cd*]pireno, en muestras de corazón, hígado, intestino, músculo, pulmón y riñón de aves rapaces, ya que se acorta considerablemente el tiempo del proceso y el volumen de disolvente y, se elimina la necesaria etapa de purificación de los métodos tradicionales.

Este procedimiento supone la utilización de metanol como modificador del anhídrido carbónico; el empleo de sílica al 15% como adsorbente; columna de octadecilsilano y acetonitrilo como eluyente.

2. Se propone la utilización de la espectrofluorimetría sincrónica para la selección de las λ_{exc} y λ_{em} óptimas para estos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

3. La identificación y confirmación de los analitos estudiados se realiza previa selección de las λ_{exc} y λ_{em} , mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, sobre la base de los tiempos de retención, y de los espectros sincrónicos de fluorescencia, con valores de precisión relativa del orden de 5% y recuperaciones superiores al 90%. Los límites de detección y de cuantificación se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) utilizados para la cuantificación de los diez PAHs en ACN por HPLC-FL.

hidrocarburos aromáticos policíclicos	$\lambda_{\text{exc}}\text{-}\lambda_{\text{em}}$	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
Antraceno	250-400	0.039	0.080
Fluoranteno	286-456	0.65	1.27
Pireno	250-400	0.16	0.26
Benzo[<i>a</i>]antraceno,	270-390	0.11	0.201
Criseno	270-390	0.36	0.64
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	296-426	0.50	1.003
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	296-406	0.093	0.14
Benzo[<i>a</i>]pireno	296-406	0.134	0.200
Benzo[<i>ghi</i>]perileno	296-426	0.47	0.75
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	300-464	12.4	30.6

4. Se ha establecido el contenido en humedad de las 220 muestras analizadas para poder expresar los resultados en materia seca. Análogamente se ha hecho una estimación del contenido en grasa.

5. De los diez hidrocarburos aromáticos policíclicos estudiados se han encontrado Antraceno, Fluoranteno, Pireno y Benzo[*a*]antraceno, en las tres especies de aves rapaces analizadas. El Benzo[*a*]pireno y Benzo[*k*]fluoranteno sólo se encuentran en una víscera (corazón R-1 e hígado L-3, respectivamente), y el Benzo[*b*]fluoranteno en dos vísceras (hígado L-7 y L-9).

6. En el ratonero, el Pireno se encuentra en un 41.1% de las muestras, con un valor medio de 1.928 µg/kg expresado en materia seca; el Fluoranteno en un 16.1% con un valor medio de 0.7630 µg/kg expresado en materia seca, y el Benzo[*a*]antraceno en un 12.5% con un valor medio de 0.1620 µg/kg expresado en materia seca. De las diez aves estudiadas, tres presentan niveles de polución en cinco de las vísceras analizadas y solamente hay un ave en la que no se detecta ninguno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos estudiados.

7. En el cárabo, el Fluoranteno se encuentra en un 33.3% de las muestras, con un valor medio de 5.048 µg/kg expresado en materia seca y el Antraceno en un 25.0% con un valor medio de 0.1008 µg/kg expresado en materia seca.

8. En la lechuza, el Pireno se encuentra en un 47.7%% de las muestras, con un valor medio de 2.028 µg/kg expresado en materia seca; el Antraceno en un 43.1% con un valor medio de 0.3980 µg/kg expresado en materia seca; el Fluoranteno en un 35.4% con un valor medio de 4.855 µg/kg expresado en materia seca y el Benzo[*a*]antraceno en un 12.3% con un valor medio de 1.451 µg/kg expresado en materia seca.

9. Por especies, la menos polucionada es el cárabo y la más polucionada la lechuza.

10. En función de las muestras se puede observar que la más polucionada es el pulmón, seguida del intestino y riñón, y la menos el músculo. Aplicado el análisis de la varianza, sólo se aprecian diferencias significativas en los niveles de Pireno encontrados en el pulmón, con relación al hígado y al músculo.

11. Por sexo, las hembras, con niveles más altos de grasa, presentan cantidades más altas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos analizados, salvo para el Fluoranteno, aunque no se observan diferencias significativas.

12. Finalmente, el Fluoranteno, Pireno y Benzo[*a*]antraceno, hidrocarburos aromáticos policíclicos de cuatro anillos, presentan niveles más elevados en el pulmón. Esto, unido a que son los que se forman más fácilmente en los procesos de combustión, parece indicar que la principal fuente de polución de estas aves es el aire.





REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS SUBCOMMITTEE ON ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 1980, *Anal. Chem.*, Guidelines for data adquisition and data evaluation in environmental chemistry, 52 (14), 2242-2249.

ALI, Md. Y. and COLE, R. B., 1998, *Analytical Chemistry*, SFE Plus C₁₈ Lipid Cleanup method for selective extraction and GC/MS quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in biological tissues, 70, 3242-3248.

ALLOWAY, B. J. and AYRES, D. C., 1993, Chemical principles of environmental pollution, Ed. Chapman & Hall, London, UK.

AL-YAKOOB, S., SAEED, T. and HASHASH, H., 1993, *Marine Pollution Bulletin*, Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible tissue of fish from the gulf after the 1991 oil spill, 27, 297-301.

APHA (American Public Health Association), **AWWA** (American Water Wroks Association), **WPCF** (Water Pollution Control Federation), 1992, *Standards methods for examination of water and wastewater*, Ed. APHA, Washington.

ASTM (American Society for Testing Materials), 1989, *Annual Book of ASTM Standard A*, ASTM 11th Ed.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1990, www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/ToxProfiles.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1995, www.atsdr.cdc.gov:8080/cxcx3.html.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1996, www.atsdr.cdc.gov/tfacts69.html.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1997a, www.atsdr.cdc.gov/97list.html.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1997b, www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/mrls.html.

AYRTON, A. D., McFARLANE, M., WALKER, R., NEVILLE, S., COOMBS, M. M. and IOANNIDES, C., 1990, *Toxicology*, Induction of the P-450 I family of proteins by polycyclic aromatic hydrocarbons: possible relationship to their carcinogenicity, 60, 173-186.

BARNABAS, I. J., DEAN, J. R., TOMLINSON, W. R. and OWEN, S. P., 1995, *Analytical Chemistry*, Experimental design approach for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using supercritical carbon dioxide, 67, 2064-2069.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H. and GARRIGUES, P., 1997, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels, 359, 502-509.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H. and GARRIGUES, P., 1998, *Marine Pollution Bulletin*, PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms, 36 (8), 577-586.

BENNER, B. A. J., 1998, *Analytical Chemistry*, summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples, 70, 4594-4601.

BERSET, J. D., EJEM, M., HOLZER, R. and LISCHER, P., 1999, *Analytica Chimica Acta*, Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples, 383, 263-275.

BICKING, M. K. L., HAYES, T. G., KILEY, J. C. and DEMING, S. N., 1993, *Journal of Chromatographic Science*, An experimental design approach to the optimization of supercritical fluid extraction for the determination of oil and grease in soil, 31, 170-176.

BOE de 29 de Agosto de 1979, recoge el Método Oficial para la determinación de la grasa en carnes.

BORGERT, C. J., ROBERTS, S. M., JAMES, R. C. and HARBISON, R. D., 1993, *Health Risk Assessment. Dermal and Inhalation exposure and Absorption of Toxicants*, Wang, R. G. M., Kanaak, J. B., Maibach, H. I. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 455-470.

BORIES, G., 1990, *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Ed. Omega, S. A. Barcelona, 296-318.

BRINZAL, Madrid 1998, [www. Quercus.es/brinzal](http://www.Quercus.es/brinzal)

BURFORD, M. D., HAWTHORNE, S. B. and MILLER, D., 1993, *Analytical Chemistry*, Extraction rates of spiked versus native PAHs from heterogeneous

environmental samples using supercritical fluid extraction and sonication in methylene chloride, 65, 1497-1505.

CALVO REVUELTA, C., DE LA FUENTE SANTIAGO, E. and RODRIGUEZ VÁZQUEZ, J. A., 1999, *Environmental Technology*, Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in emissions from coal-fired power plants: the influence of operation parameters, 20, 61-68.

CAMEL, V., TAMBUTÉ, A. and CAUDE, M., 1992a, *Analisis*, L'extraction en phase supercritique á l'èchelle analytique: principe, mise en ceuvre et applications, 20, 503-528.

CAMEL, V., THIEBAUT, D. and CAUDE, M., 1992b, *Analisis Magazine*, Supercritical fluid chromatography and extraction, 20 (8), 18-21.

CARDELLICCHIO, N., CAVALLI, S. and RAGONE, P., 1996, *Polycyclic Aromatic Compound*, Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine sediments and GC-MS analysis, 9, 365-372.

CARLS, M. G., RICE, S. D. and HOSE, J. E., 1999, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larvac pacific herring (*Clupea pallasii*), 18 (3), 481-493.

CHEE, K. K., WONG, M. K. and LEE, H. K., 1996, *Journal of Chromatography A*, Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction systems with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry, 723, 259-271.

CLEEMANN, M., PAULSEN, G. B., PRITAL, G., RIGET, F., POULSEN, M. E., DE BOER, J. and KLUGSOYR, J., 1997, *Organohalogen Compounds*, Organochlorines in sediments and biota from Greenland, 32, 268-271.

COCCHIERI, R. A., ARNESE, A. and MINICUCCI, A. M., 1990, *Marine Pollution Bulletin*, Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Italian Central Mediterranean Coasts, 2 (1), 15-18.

CODINA, G., VAQUERO, M. T., COMELLAS, L. and BROTO-PUIG, F., 1994, *Journal of Chromatography A*, Comparison of various extraction and clean-up methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils, 673, 21-29.

CONNELL, D. W., 1997, *Basic concepts of Environmental Chemistry*, CRC Press LLC, 2000 Corporate Blvd, N. W., Boca Raton, Florida.

DANKERS, J., GROENENBOOM, M., SCHOLTIS, L.H.A. and VAN DER HEIDEN, C., 1993, *Journal of chromatography*, High-speed supercritical fluid extraction method for routine measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental soils with dichloromethane as a static modifier, 641, 357-362.

DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. and SARGATAL, J., 1994, *Handbook of the birds of the world*, Vol. 2, Ed. Lynx, Barcelona.

DERACHE, R., 1990, *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Ed. Omega, S. A., Barcelona, 296-318.

DEUSTER, R., LUBAHN, N., FRIEDRICH, C. and KLEIBÖHMER, W., 1997, *Journal of Chromatography A*, Supercritical CO₂ assisted liquid extraction of nitroaromatic and polycyclic aromatic compounds in soil, 785, 227-238.

DÍAZ, M., ASENSIO, B. and TELLERIA, J. L., 1996, *Aves Ibéricas*, Ed. Meyero, Madrid.

DUJMOV, J., SUCEVIC, P. and TONKOVIC, M., 1994, *Toxicological and Environmental Chemistry*, Ratio between PAH content in fish-striped mullet and sediments in the Eastern Adriatic Sea, 46, 73-80.

FABRE, R. and TRUHAUT. R., 1976, *Tratado de Toxicología*, Tomo I, Ed. Paraninfo, S. A. Madrid, 197-202.

FAWELL, J. K. and HUNT, S., 1988, *Environmental Toxicology: organic pollutants*, Ed. Ellis Horwood, England, 241-269.

FERNÁNDEZ, I., DACHS, J. and BAYONA, J. M., 1996, *Journal of Chromatography A*, Application of experimental design approach to the optimization of supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons, 719, 77-85.

FERRER, R., GUITERAS, J. and DELTRÁN, J. L., 1996, *Analytical Letters*, Optimization of an on-line precolumn precocentration method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water samples (river and sea water), 29 (12), 2201-2219.

FIESER, L. F. and FIESER, M., 1966, *Química orgánica superior*, Tomo II, Ed. Grijalbo, S. A. Barcelona, México D. F., 1149-1156.

FRIEDRICH, C. and KLEIBÖHMER, W., 1997, *Journal of Chromatography A*, Supercritical CO₂-assisted liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans from solid matrices, 777, 289-294.

FURTON, K. G. and LIN, Q., 1993, *Journal of Chromatographic Science*, Variation in the supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls as a function of sorbent type extraction cell dimensions and fluid flow rate, 31, 201-206.

GADZALA, R. M. and BUSZEWSKI, B., 1995, *Polish Journal of Environmental Studies*, Properties and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using chromatographic methods, 4 (1), 5-15.

GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A. and SIMAL LOZANO, J., 1999a, *Journal of Chromatography A*, Determination of Benzo[*a*]pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL, 16(1), 9-14.

GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A., LAFFON LAGE, B. and SIMAL LOZANO, J., 1999b, *Talanta*, Application of the effects of solvent and dissolved oxygen on the determination of Benzo[*a*]pyrene by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry in smoke-flavouring, 48, 377-384.

GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A., LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M- J. and SIMAL LOZANO, J., 1996a, *Food Additives and Contaminants*, Determination of Benzo[*a*]pyrene in lipid-soluble liquid smoke (LSLS) by HPLC-FL, 13 (7), 863-870.

GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A., LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M- J. and SIMAL LOZANO, J., 1996b, *Journal of*

Chromatography A, Enrichment of Benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by liquid chromatography-fluorescence detector, 753, 207-215.

GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A., LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M- J. and SIMAL LOZANO, J., 1996c, *Talanta*, Determination of Benzo[a]pyrene in smoking-flavour agents (water-soluble liquid smoke) by second derivative constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry, 43, 659-664.

GERE, D. R., KNIPE, C. R., CASTELLI, P., HEDRICK, J., RANDALL, F. L. G., SCHULENBERG-SCHELL, H., SCHUSTER, R., DOHERTY, L., OROLIN, J. and LEE, H. B., 1993, *Journal of Chromatographic Science*, Bridging the automation gap between sample preparation and analysis: an overview of SFE, GC, GC-MS, and HPLC applied to environmental samples, 31, 246-258.

GUILLEN, M. D., 1994, *Food Additives and Contaminants*, Polycyclic aromatic compounds: extraction and determination in food, 11 (6), 669-684.

GUINAMANT, J. L., 1992, *Analisis Magazine*, L'extraction en phase supercritique (SFE), 20 (1), M36-M38.

HAWTHORNE, S. B. and MILLER, D., 1986, *Journal of Chromatographic Science*, Extraction and recovery of organic pollutants from environmental solids and Tenax-GC using supercritical CO₂, 24, 258-264.

HAWTHORNE, S. B. and MILLER, D., 1987, *Analytical Chemistry*, Extraction and recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solids using supercritical fluids, 59 (13), 1705-1708.

HAWTHORNE, S. B., KRIEGER, M. S. and MILLER, D., 1989, *Analytical Chemistry*, Supercritical carbon dioxide extraction of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, heteroatom-containing polycyclic aromatic hydrocarbons, and *n*-alkanes from polyurethane foam (PUF) sorbents, 61 (7), 736-740.

HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J., BURFORD, M. D., LANGENFELD, J. J., ECKERT-TILOTTA, S. and LOUIE, P. K., 1993, *Journal of Chromatography*, Factors controlling quantitative supercritical fluid extraction of environmental samples, 642, 301-317.

HEATON, D. M., BARTLE, K. D., CLIFFORD, A. A., MYERS, P. and KING, B. W., 1994, *Chromatographia*, Rapid separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by packed column supercritical fluid chromatography, 39 (9/10), 607-611.

HEINTZ, R. A., SHORT, J. W. and RICE, 1999, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil, 18 (3), 494-503.

HELLOU, J. and UPSHALL, C., 1995, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, Monocyclic aromatic hydrocarbons in bile of flounder exposed to a petroleum oil, 60, 101-111.

HELLOU, J., PAYNE, J. F. and HAMILTON, C., 1994a, *Environmental Pollution*, Polycyclic aromatic compounds in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*), 84, 197-202.

HELLOU, J., PAYNE, J. F., UPSHALL, C., FANCEY, L.L. and HAMILTON, C., 1994b, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Bioaccumulation of aromatic hydrocarbons from sediments: a dose-response study with flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), 27, 477-485.

HELLOU, J., UPSHALL, I. H. Ni, PAYNE, J. F. and HUANG, Y. S., 1991, *Arch. Environmental Contamination and Toxicology*, Polycyclic aromatic hydrocarbons in harps seals (*Phoca groenlandica*) from the Northwest Atlantic, 21, 135-140.

HEWLETT PACKARD, 1990, Preparing samples by supercritical fluid extraction, Manual 07680-90330, Edition 1, USA.

HILLS, J. W. and HILL, H. H., 1993, *Journal of Chromatographic Science*, Carbon dioxide supercritical fluid extraction with a reactive solvent modifier for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, 31, 6-12.

HOLLENDER, J., SHNEINE, J., DOTT, W., HEINZEL, M., HAGEMAN, H. W. and GÖTZ, G. K. E., 1997, *Journal of Chromatography A*, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases, 776, 233-243.

HOLOUBEK, I., HOUSKOVA, L., HOLOUBKOVA, I., KOTT, F., KORINEK, P., BOHACEK, Z., CASLAVSKY, J., BEZACINSKY, M., MIKES, C., HORAK, M., KOCAN, A. and PETRIK, L., 1990a, *Toxicol. Environ. Chem.*, Project TOCOEN. The fate of select organic pollutants in the environment. I. Introduction, 29, 9-17.

HOLOUBEK, I., PAASIVIRTA, J., MAATELA, P., LAHTIPERÄ, M., HOLOUBKOVA, I., KORÍNEK, P., BOHÁČEK, Z. and CASLAVSKY, J., 1990b, *Toxicol. Environ. Chem.*, Comparison of extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in sediments, 25, 137-154.

HÖNER, A., ARNOLD, M., HÜSERS, N. and KLEIBÖHMER, W., 1995, *Journal of Chromatography A*, Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons in waste gases, 710, 129-137.

HSIEH, Y.-Z. and CHANG, A.-C., 1997, *Analytica Chimica Acta*, Effects of analyte-matrix interactions on supercritical fluid extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons, 342, 41-50.

HÜSERS, N. and KLEIBÖHMER, W., 1995, *Journal of Chromatography A*, Studies on trapping efficiencies of various collection devices for off-line supercritical fluid extraction, 697, 107-114.

INTER NATURA, www2.uji.es/cyes/internatura/guias/rapaces/bb.html.

ISCO APPLICATIONS BULLETIN, 1991, A comparison of SFE and Soxhlet methods for extraction of organic analytes, 71, 1-10.

IUPAC, 1979, Nomenclature of organic chemistry, Ed. Pergamon Press.

JÄRVENPÄÄ, E., HUOPALAHTI, R. and TAPANAINEN, P., 1996, *J. Liquid. Chrom. & Rel. Technol.*, Use of supercritical fluids extraction-high performance liquid chromatography in the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons from smoked and broiled fish, 19 (9), 1473-1482.

KALF, D. F., CROMMENTUIJN, T. and VAN DE PLASSCHE, E. J., 1997, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 36, 89-97.

KANAGASABAPATHY, V. M., BELL, R. W., YANG, P., ALLAN, L., AU, L., PARMAR, J., LUSIS, M. A. and CHAPMAN, R. E., 1995, *Journal of Chromatographic Science*, Developments in the supercritical fluid extraction of PAHs from environmental matrix, 33, 467-474.

KARCHER, W., 1985, *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*, Vol. 2, A. Borjseth y T. Ramdahl (Des), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 385-406.

KATIYAR, S. K., AGARWAL, R. and MUKHTAR, H., 1993, CRC Handbook of Chromatography: *Liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons*, Eds. H. S. Rathore y Sherma, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-7.

KENNICUTT, M. C. McDONALD, T. J., DENOUX, G. J. and McDONALD, S. J., 1992a, *Marine Pollution Bulletin*, Hydrocarbons contamination on the Antarctic Peninsula I. Arthur Harbor-subtidal sediments, 24 (10), 499-506.

KENNICUTT, M. C. McDONALD, T. J., DENOUX, G. J. and McDONALD, S. J., 1992b, *Marine Pollution Bulletin*, Hydrocarbons contamination on the Antarctic Peninsula II. Arthur Harbor-Inter-and subtidal limpets (*Nacella concinna*), 24 (10), 506-511.

KENNY, D. V. and OLESIK, S., 1998a, *Journal of Chromatographic Science*, Extraction of lignite coal fly ash for polynuclear aromatic hydrocarbons: modified and unmodified supercritical fluid extraction, enhanced-fluidity solvents, and accelerated solvent extraction, 36, 59-65.

KENNY, D. V. and OLESIK, S., 1998b, *Journal of Chromatographic Science*, Extraction of bituminous coal fly ash for polynuclear aromatic hydrocarbons: evaluation of modified and unmodified supercritical fluid extraction, enhanced fluidity solvents, and accelerated solvent extraction, 36, 66-72.

LAFFON LAGE, B., GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., LAGE YUSTY, M. A. and SIMAL LOZANO, J., 1997, *Food Additives and Contaminants*, Comparison of supercritical fluid extraction and conventional liquid-solid extraction for the determination of Benzo[a]pyrene in water-soluble smoke, 16 (1), 9-14.

LANGENFELD, J. J., BURFORD, M. D., HAWTHORNE, S. B. and MILLER, D., 1992, *Journal of Chromatography*, Effects of collection solvent parameters and extraction cell geometry on supercritical fluid extraction efficiencies, 594, 297-307.

LANGENFELD, J. J., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J. and PAWLISZYN, J., 1994, *Analytical Chemistry*, Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of environmental samples, 66 (6), 909-915.

LANGENFELD, J. J., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J. and PAWLISZYN, J., 1995, *Analytical Chemistry*, Kinetic study of supercritical fluid extraction of organic contaminants from heterogeneous environmental samples with carbon dioxide and elevated temperature, 67, 1727-1736.

LAWRENCE, J., 1984, *Foods constituents and food residues, Their chromatographic determination*, Marcel Dekker Inc.

LEE, H. B., PEART, T. E., HONG-YOU, R. L. and GERE, D. R., 1993, *Journal of Chromatography A*, Supercritical carbon dioxide extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments, 653, 83-91.

LEE, H. B., PEART, T. E., NIIMI, A. J. and KNIPE, C. R., 1995, *Journal of AOAC International*, Rapid supercritical carbon dioxide extraction method for determination of polychlorinated biphenyls in fish, 78 (2), 437-444.

LEE, R. G. M. and JONES, K. C., 1999, *Environmental Science & Technology*, The influence of meteorology and air masses on daily atmospheric PCB and PAH concentrations at a UK location, 33, 705-712.

LESKO, L- T., SMITH, S. B. and BLOIN, M. A., 1996, *J. Great Lakes Res.*, The effect of contaminated sediments on fecundity of the brown bullhead in three lake Erie Tributaries, 22 (4), 830-837.

LI, K., LANDRIAULT, M., FINGAS, M. and LLOMPART, M., 1998, *Analisis*, Pressurized solvent extraction of environmental organic compounds in soils using a supercritical fluid extraction, 26, 365-369.

LIENERT, D., AMMIRATA, S., MÜLLER, A. and ANKLAM, E., 1996, *Polycyclic Aromatic Compound*, Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from creosote timber, 9, 315-322.

LODOVICI, M., AKPAN, V., CASALINI, C., ZAPPA, C. and DOLARA, P., 1998, *Chemosphere*, Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a measure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany, 36 (8), 1703-1712.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J., GARCÍA FALCÓN, S., GONZÁLEZ AMIGO, S., SIMAL LOZANO, J. and LAGE YUSTY, M. A., 1996, *Talanta*, Second-derivative constant-wavelength synchronous scan spectrofluorimetry for the determination of Benzo[*b*]fluoranthene, Benzo[*a*]pyrene and Indene[1,2,3-*cd*]pyrene in drinking water, 43, 1405-1412.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J., GARCÍA FALCÓN, S., LAGE YUSTY, M. A., and SIMAL LOZANO, J., 1995a, *J. Asoc. Off. Anal. Chem. Int.*, Synchronous spectrofluorimetry determination of the six polycyclic aromatic hydrocarbons officially designated as indicators of drinking water quality, 78 (2), 402-406.

LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN, M. J., LAGE YUSTY, M. A., and SIMAL LOZANO, J., 1995b, *Talanta*, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in

drinking and surface waters from Galicia (N. W. Spain) by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry, 42, 967-970.

LÓPEZ-AVILA, V., BENEDICTO, J., DODHIWALA, N. S., YOUNG, R. and BECKERT, W. F., 1992, *Journal of Chromatographic Science*, Development of an off-line SFE-IR method for petroleum hydrocarbons in soils, 30, 335-343.

LÓPEZ-AVILA, V., YOUNG, R., TEHRANI, J., DAMIAN, J., HAWTHORNE, S., DANKERS, J. and VAN DER HEIDEN, C., 1994, *Journal of Chromatography A*, Mini-round-robin study of a supercritical fluid extraction method for polynuclear aromatic hydrocarbons in soils with dichloromethane as a static modifier, 672, 167-175.

LUTERMAN, C., WILLEMS, E., WOLFGANG, D. and HOLLENDER, J., 1998a, *Journal of Chromatography A*, Effects of various binary and ternary supercritical phases on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil, 816, 201-211.

LUTERMAN, C., WOLFGANG, D. and HOLLENDER, J., 1998b, *Journal of Chromatography A*, Combined modifier/in situ derivatization effects on supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, 811, 151-156.

MÄKELÄ, M. and PYY, L., 1995, *Journal of Chromatography A*, Effect of temperature on retention time reproducibility and on the use of programmable fluorescence detection of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons, 699, 49-57.

MCDONALD, S. J., KENNICUTT M. C., LIU, H. and SAFE, S. H., 1995, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Assessing aromatic hydrocarbon exposure in Antarctic fish captured near Palmer and McMurdo Stations, Antarctica, 29, 232-240.

McDONALD, S. J., KENNICUTT, M. C. and BROOKS, J. M., 1992, *Marine Pollution Bulletin*, Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) exposure in fish from the Antarctic Peninsula, 25 (9-12), 313-317.

MCDONALD, S. J., WILLET, K. L., SAFE, S. H., BEATTY, K. B., STEINBERG, M., MAYOR, P. and KENNICUTT M. C., 1996, *Polycyclic Aromatic Compounds*, Validation of bioassays for assessing the contamination of marine environments, 11, 57-65.

MEYER, A. and KLEIBÖHMER, W., 1993, *Journal of Chromatography A*, Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from a marine sediment and analyte collection via liquid-solid trapping, 657, 327-335.

MIÉGE, M., DUGAY, J. and HENNION, M.-C., 1998, *Journal of Chromatography A*, Optimization and validation of solvent and supercritical-fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection, 823, 219-230.

MILLER, D. J., HAWTHORNE, S. and McNALLY, M. E. P., 1993, *Analytical Chemistry*, Solventless collection of analytes by rapid depressurization after static supercritical fluid extraction, 65, 1308-1042.

MONSERRATE, M. and OLESIK, S. V., 1997, *Journal of Chromatographic Science*, Evaluation of SFE-CO₂ and methanol-CO₂ mixtures for the extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from house dust, 35, 82-90.

MONSON, P. D., CALL, D. J., COX, D. A., LIBER, K. and ANKLEY, G. T., 1999, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Photoinduced toxicity of fluoranthene to northern leopard frogs (*Rana pipiens*), 18 (2), 308-312.

MOTHERSHEAD, R. F. and HALE, R. C., 1992, *Marine Environmental Research*, Influence of Ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes Sapidus*), 33, 145-156.

ORDEN del 9 de Julio de 1998 por la que se incluyen determinadas especies en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas y cambian de categoría otras especies que ya están incluidas en el mismo (BOE 172/1998 del 20 de Julio de 1998), modifica el Anexo I del Real Decreto 439/1990, de 30 de Marzo, corregida el 11 de Agosto de 1998 (BOE 191/1998).

PEÑA, E., CONDE, J. E. and MONTELONGO, F.G., 1996, *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, Polycyclic aromatic hydrocarbons and n-alkanes in *Osilinus attratus* from the coast of Tenerife (Canary Islands), 57, 803-810.

PERFETTI, G. A., NYMAN, P. J., FISHER, S., JOE, F. L. and DIACHENKO, G. W., 1992, *Journal of AOAC International*, Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection, 75 (5), 872-877.

PERKIN ELMER, 1993, *HPLC system for PAH analysis*, The Perkin Elmer Corporation, Norwalk.

PERRINS, C., 1987, *Aves de España y de Europa*, Eds. Omega S. A., Barcelona.

PICHON, V., AULARD-MACLER, E., OUBIHI, H., SASSIAT, P., HENNION, M. C. and CAUDE, M., 1997, *Chromatographia*, Supercritical-fluid extraction coupled with immunoaffinity clean-up for the trace analysis of organic pollutants in different matrices, 46 (9/10), 529-536.

PLATE, D. and GIESBERG, R., 1996, *GIT Fach. Lab.*, Erfahrungen mit der überkritischen fluidextraktion (SFE) von PAK aus bodenproben, 40 (1), 38-42.

PORTER, N. L., RYNASKY, A. F., CAMPBELL, E. R., SAUNDERS, M., RICHTER, B. E., SWANSON, J. T., NIELSEN, R. B. and MURPHY, B. J., 1992, *Journal of Chromatographic Science*, Estudios of linear restrictors and analyte collection via solvent trapping after supercritical fluid extraction, 30, 367-373.

READMAN, J. W., TOLOSA, I., LAW, A. T., BARTOCCI, J., AZERMARD, S., HAMILTON, T., MEE, L. D., WAGENER, A., TISSIER, M. LE, ROBERTS, C., DOWNING, N. and PRICE, A. R. G., 1996, *Marine Pollution Bulletin*, Discrete bands of petroleum hydrocarbons and molecular organic markers identified within massive coral skeletons, 32 (5), 437-443.

REAL DECRETO 439/1990, de 30 de Marzo, por el que se regula el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (BOE 82/1990 del 5 de Abril de 1990).

REAL DECRETO 833/1988 de 20 de Julio del Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, por el que se aprueba el reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986 Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos (BOE 182/1988, 30 de julio de 1988).

REAL DECRETO 952/1997 de 20 de Junio, por el que se modifica el reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986 de 14 de Mayo Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos aprobado mediante Real Decreto 833/1988 de 20 de Julio (BOE 160/1997, 5 de Julio de 1997).

REIMER, G. and SUAREZ, A., 1995, *Journal of Chromatography A*, Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils, 699, 253-263.

REINDL, S. and HÖFLER, F., 1994, *Analytical Chemistry*, Optimization of the parameters in supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil samples, 66, 1808-1816.

RODRIGUEZ, C., BISPO, A., HAAG, J. L., CHOLLOT, A., JAUZIN, M. and COLIN, F., 1997, *Analisis*, Caractérisation des sols pollués par des HAP: apports de l'extraction par fluides supercritiques (SFE), 25 (9/10),

SABER, A., MOREL, G., PATUREL, L., JAROSZ, J., MARTIN-BOUYER, M. and VIAL, M., 1991, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Application of the high-resolution low temperature spectrofluorimetry to analysis of PAHs in lake sediments, marine intertidal sediments and organisms, 339, 716-721.

SETO, H., OHKUBO, T., KANO, T., KOIKE, M., NAKAMURA, K. and KAWAHARA, Y., 1993, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the lung, 24, 498-503.

SHAW, G. R. and CONNELL, D. W., 1994, *Rev. Environ. Contam.*, Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs), T 135, 1-62.

SHCHEKATURINA, T. L., KHESINA, A. L., MIRONOV, O. G. and KRIVOSHEEVA, L. G., 1995, *Marine Pollution Bulletin*, Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels from the Black Sea, 30 (1), 38-40.

SHERMA, J., 1993, *Handbook of Chromatography: Liquid –chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons*, CRC Press Inc., 2000 Corporate Blvd., N. W., Boca Raton, Florida.

SISOVIC, A., FUGAS, M. and SEGA, K., 1996, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, Assessment of human inhalation exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, 6 (4), 439-447.

SMITH, A. A., NEW, R. A., WILES, J. E. and KLEINOW, K. M., 1996, *Marine Environmental Research*, Effect of varying sediment organic carbon content upon the dermal bioavailability and disposition of Benzo(a)pyrene in the catfish, *Ictalurus punctatus*, 42 (1-4), 87-91.

SOCLO, H. H., GARRIGUES, P. and EWALD, M., 1986, *Analisis*, Analyse quantitative des hydrocarbures aromatique polycyques dans les sediments marins récents par chromatographie en phase liquide et détection spectrofluorimétrique, 14 (7), 344-350.

TENA, M. T., LUQUE DE CASTRO, M. D. and VALCÁRCEL, M., 1994, *Chromatographia*, Systematic study of the influence of modifiers on the CO₂-supercritical extraction of PAHs in soil, 38 (7/8), 431-435.

THOMPSON, D., JOLLEY, D. and MAHER, W., 1993, *Microchemical Journal*, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in oyster tissues by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection, 47, 351-362.

TRAPIDO, M. and VEDRE, I., 1996, *Hydrobiologia*, On polynuclear aromatic hydrocarbons contamination levels in the ecosystem ok Lake Peipsi in the 1970s-1980s, 338, 185-190.

UTHE, J. F., MISRA, R. K. and KING, T., 1996, *Journal of AOAC International*, Estimating analytical variances in measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons and application to monitoring contaminants in American Lobster (*Hpmarus americanus*), 79 (3), 797-802.

VAN BRUMMELEN, T. C., VAN GESTEL, C. A. M. and VERWEIJ, R. A., 1996c, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Long-term toxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons for the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*, 15 (7), 1199-1210.

VAN BRUMMELEN, T. C., VERWEIJ, R. A. and VAN STRAALLEN, N. M., 1991, *Comp. Biochem. Physiol.*, Determination of Benzo(a)pyrene in Isopods (*Porcellio scaber*) exposed to contaminated food, 100C (1/2), 21-24.

VAN BRUMMELEN, T. C., VERWEIJ, R. A., WEDZINGA, S. A. and VAN GESTEL, C. A. M., 1996a, *Chemosphere*, Enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest soils near a blast furnace plant, 32 (2), 293-314.

VAN BRUMMELEN, T. C., VERWEIJ, R. A., WEDZINGA, S. A. and VAN GESTEL, C. A. M., 1996b, *Chemosphere*, Polycyclic aromatic hydrocarbons in earthworms and isopods from contaminated forest soils, 32 (2), 315-341.

VAN DER KRAAN, C. and VAN WINGERDEN, W. K. R. E., 1996, *Proc. Exper. & Appl. Entomol.*, Use of the eggs of the large marsh grasshopper (*Stethophyma grossum* L) for testing the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), 7, 217-222.

VAN DER OOST, R., VAN SCHOOTEN, F. J., ARIESE, F., HEIDA, H., SATUMALAY, K. and, VERMEULEN, N. P. E., 1994, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey, 13 (6), 859-870.

VAN STRAALLEN, N. M. and VERWEIJ, R. A., 1991, *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, Effects of Benzo(a)pyrene on food assimilation and growth efficiency in *Porcellio scaber* (Isopoda), 46, 134-140.

WANG, Z., FINGAS, M., LANDRIAULT, M., SIGOUIN, L., FENG, Y. and MULLIN, J., 1997, *Journal of Chromatography A*, Using systematic and comparative analytical data to identify the source of an unknown oil on contaminated birds, 775, 251-265.

WARE, G. W., 1994, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs), 135, 1-62.

WENCLAWIAK, B. W., PASCHKE, T. and KRAPPE, M., 1997, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from native soil and fly ash with pure and modified carbon dioxide and dimethylether, 357, 1128-1132.

WHO, 1984, *Guidelines for Drinking water quality*, Vol. 1 y 2, Health Criteria and Other Supporting Information, Geneva.

WHO, 1987, *Air Quality Guidelines for Europe*. Geneva.

WIN, T., LUTHER, W., JACOB, J., VAESSEN, H. A. M. G. and BOENKE, A., 1998, *Fresenius J. Anal. Chem.*, Reference materials for PAHs in foodstuffs: results of the certification exercise of two coconut oil reference materials, 360, 640-644.

WISE, S. A., SCHANTZ, M. M., PARRIS, R. M., REBBERT, R. E., BENNER, B. A. and GILLS, T. E., 1992, *Analusis*, Standard reference materials for trace organic contaminants in the marine environment, 20 (6), M57-M61.

YANG, Y., GHARAIBEH, A., HAWTHORNE, S. B. and MILLER, D. J., 1995, *Analytical Chemistry*, Combined temperature/modifier effects on supercritical CO₂ extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental samples, 67, 641-646.